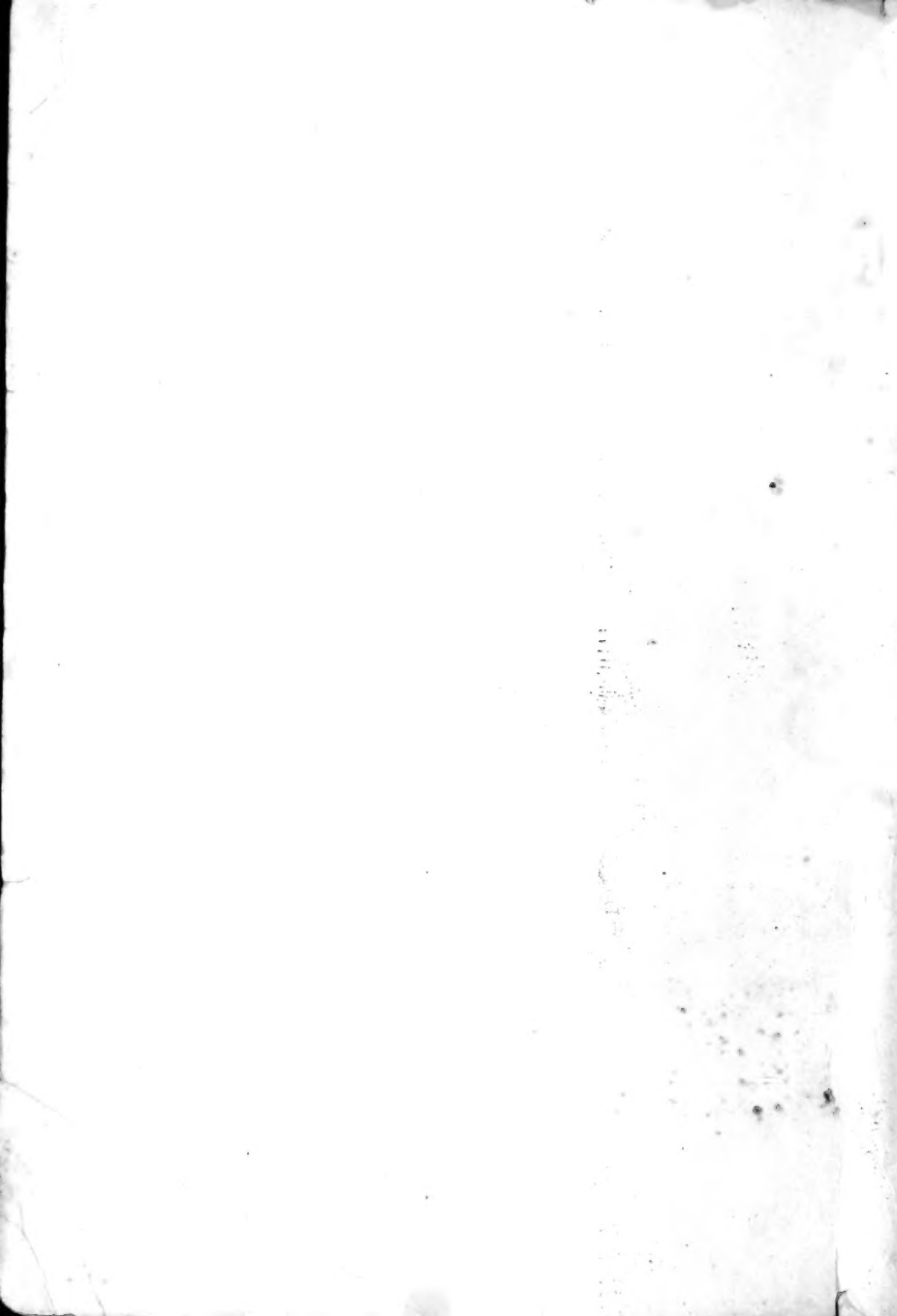


范培昌 编著

生物大分子印渍技术和应用

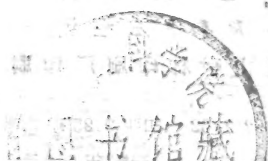
上海科学技术文献出版社



58.17
330

生物大分子印渍技术和应用

范培昌 编著



中科院植物所图书馆



S0011801

上海科学技术文献出版社

25227

生物大分子印渍技术和应用

范培昌 编著

上海科学技术文献出版社出版发行
(上海市武康路2号)

新华书店经销

昆山亭林印刷厂印刷

开本 787×1092 1/32 印张 9.25 字数 223,000

1989年6月第1版 1989年6月第1次印刷

印数: 1—4,000

ISBN 7-80513-333-6/Q·12

定价 5.70 元

《科技新书目》185-256

编 者 的 话

新技术的开发和应用促进了生命科学的发展,这是从事生命学科的人们所熟知的真谛。近十年来,生命科学中又出现了三项具革命性的新技术:DNA 序列快速分析术,单克隆抗体生产术和生物大分子印渍术。和以往新技术出现时的情景不同,这三项技术诞生后仅一二年就都得到广泛的认可。报道之多,应用面之广,都是以往所不及。今天,它们虽在理论与实践两方面都已取得丰硕成果,然发展势头却有增无减。

生物大分子印渍术简便易行,既具有凝胶电泳的高分辨率、生物分子亲和技术的高灵敏度,又能将所得结果长期保存而深受欢迎。今天,它已在生物化学、分子生物学、免疫学、医学、细胞生物学、植物生理学等学科得到广泛应用。更可喜的是,印渍术已进入临床检验等部门,为病原诊断作出贡献。可以预言,随着本技术的继续发展,印渍术必会成为生命学科各领域实验室中必不可少的一项常规技术。

本书的编写将以方法学为主线,希望在参阅本书后能使读者基本上理解和掌握这项极为有用的新技术,希望本书能解答实际操作中所遇到的种种疑难问题。全书共分六章,前两章为概念和原理;三、四章讨论装置与操作;最后两章介绍发展和应用。限于篇幅,“应用”一章中将偏重分子生物学与医学,有关其它方面的应用将以实例形式穿插于各章间。自认为这样做,既可限制住篇幅,又可反应印渍术应用的广泛性。鉴于编著者知识浅薄、实践又少,错误之处在所难免,欢迎读者批评指正,共同进步。

范培昌(华东师范大学生物系,上海)

一九八七年四月

目 录

第一章	引言	(1)
一	生物大分子印渍术的概念	(1)
二	生物大分子印渍术的演变与发展	(3)
三	印渍过程及常用术语	(9)
四	印渍术的评价	(14)
五	印渍术的应用与前景	(17)
第二章	印渍术原理及其影响因素	(25)
一	印渍效率	(25)
二	与凝胶电泳有关的印渍原理	(28)
三	与固定化技术有关的印渍原理	(44)
四	与分子亲和技术有关的印渍原理	(59)
第三章	印渍装置与操作	(73)
一	毛细作用印渍装置与操作	(74)
二	扩散印渍装置与操作	(79)
三	电印渍装置与操作	(80)
四	其它辅助装置与操作	(94)
第四章	实验技术	(106)
一	印渍模板的选择与加工	(106)
二	印渍用纸的选择与加工	(119)
三	印渍缓冲液的选择	(131)
四	印渍步骤的操作要点	(132)
五	猝灭及猝灭剂的选择	(152)
六	印渍纸染色方法	(158)

七	印渍分子的特异性检出——印盖术	(169)
第五章	有关印渍的其它技术	(191)
一	点印渍术	(191)
二	细胞印盖术	(202)
三	印渍纸上原位修饰术	(206)
四	生物小分子印渍术	(208)
五	测定酶活性的酶印渍术	(213)
六	印渍物的回收技术	(221)
七	在印渍纸上使用非放射性探针的分子杂交术 ...	(225)
第六章	印渍术在分子生物学与医学领域的应用	(232)
一	在研究生物分子间相互作用中的应用	(232)
二	在基因组 DNA 测序及基因定位中的应用	(237)
三	在基因结构分析中的应用	(247)
四	在基因表达、基因筛选及基因工程等方面的应用	(253)
五	在遗传疾病诊断和治疗中的应用	(257)
六	在免疫学与自身免疫病中的应用	(265)
七	在单克隆抗体生产与研究中的应用	(271)
八	在各种传染病病理研究与临床诊断中的应用 ...	(275)
	本书所用缩写和简称	(287)

第一章 引言

一、生物大分子印渍术的概念

生物大分子印渍术始创于 1975 年, 由苏格兰爱丁堡大学 E. M. Southern 首先提出^[1]。他将限制性内切酶消化后的 DNA 片段先进行琼脂糖凝胶电泳, 已分离的 DNA 各片段就在凝胶上用氢氧化钠处理使之变性为单链。把一张硝酸纤维素纸 (Nitrocellulose paper, 简称 NC) 放在凝胶上, 利用毛细作用原理使凝胶中的 DNA 片段转移到 NC 纸上使之固定化。此时, 固定化了的 DNA 片段经得起任何处理, 可针对所需 DNA 片段采用经放射性标记的 RNA, 在 NC 上进行 DNA-RNA 分子杂交。最后经放射自显影, 即可从底片上显现出一条杂交分子的区带。全过程可用图 1-1 示意。

由于这种技术类似用吸墨纸去吸干作品上的墨迹, 使吸墨

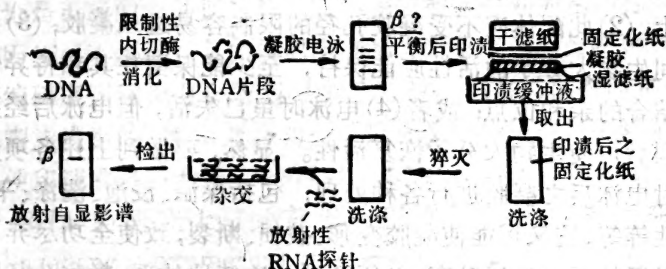


图 1-1 检出某种 β -珠蛋白基因的 DNA 印渍术全过程示意图

纸染上墨渍而被称为 Blotting^[1,2], 此词理应译为印渍术^[3]或印迹术^[4]。某些文献把它译为“原位转移^[5]”, 似使人有“去简就繁”之感。

由图 1-1 可见, 印渍术实际上是凝胶电泳技术、固定化技术及分子亲和技术三者融为一体的综合性技术。其核心在于把凝胶电泳已分离的区带转移并印渍于固定化纸上使之固定化, 并处于薄的固定化纸表面, 从而既耐其后用分子亲和技术检出所需特异性分子时所进行的种种处理, 又有利于亲和分子接近而提高灵敏度。

众所周知, 各种凝胶电泳是当代分析与纯化生物大分子最有效的技术之一。目前, 凝胶电泳的分辨率已达惊人程度。如 O'Farrell 的双相凝胶系统, 一次电泳就能分辨出 1,600 多种蛋白质^[6]。但这却出现了新问题: 要想毫不含糊地从这上千条区带中辨别出一条是我们感兴趣的功能性蛋白质, 则常是十分困难的。迄今, 虽已创立了能灵敏地特异性检出酶^[7]、抗原^[8]、糖蛋白^[9]、激素受体^[10], 或其它 DNA-RNA^[11]、蛋白质-DNA^[12]、蛋白质-DNA-DNA^[13,14]、蛋白质-蛋白质^[15,16]等的方法和技术, 但是若把这类方法直接用于凝胶电泳后的分离区带, 则要求: (1) 被鉴定的生物大分子应能亲和结合于一种容易检出的配体上; (2) 此配体应不受凝胶孔径的限制容易进入凝胶; (3) 电泳期间生物大分子的活性应能保持, 至少能保留住其和特异性配体结合的亲和位点; 或者 (4) 电泳时虽已失活, 但电泳后经某种处理后可使生物大分子恢复活性。显然, 要做到上述各项势必要对电泳后之凝胶进行各种处理, 包括保温、浸泡、洗涤、平衡、改性等等, 这又可能使凝胶变形、破损、断裂, 致使全功尽弃。更何况湿的凝胶难以贮存, 必须及时并连续地处理; 凝胶孔径限制扩散的作用, 又迫使采用较大量的, 十分昂贵又供应不足的配体

试剂。例如，通常直接检出琼脂糖凝胶上已分离的限制酶切 DNA 片段时，每一区带约需 $1\mu\text{g}$ 单链互补 DNA (cDNA)。事实上，如果想要分析来自一复杂机体的特异基因结构而又不 对基因预先提纯的话，那末将必须在一百万左右其它 DNA 类型中检出皮克 (10^{-12}g) 量的单种类型的 DNA^[17]。这就要求所用方法必须非常灵敏且具高度特异性，而直接使用凝胶来检出就有一定困难。相反，印渍术可使凝胶中的分子经印渍而浓集于固定化材料的表面，故能达到这种检出要求。正因为印渍术克服了直接用凝胶检出生物大分子时带来的种种困难，所以其一出现就被广泛接受，并很快在分子生物学和医学领域得到应用和发展。

二、生物大分子印渍术的演变与发展

Southern 于 1975 年开创 DNA 印渍术后不到一年，法国的 Chambon 小组在应用此技术研究鸡胚卵清蛋白基因时，发现分子杂交后所得放射自显影谱显现的不是一条，而是多条区带。这一偶然发现，使 Chambon 小组立即意识到其重大意义：“真核生物基因具有不编码的插入序列”^[18]。现在已经肯定这一结论是正确的，并把这种具有不编码插入序列的基因称为断裂基因 (Split gene)，其中编码序列称为外显子 (exon 或 extron)，不编码序列称为内含子 (intron)。这一杰出成果被创立 DNA 双螺旋模型的 Crick 誉之为分子遗传学中的一次“微型革命”，也使印渍术名声大振。1977 年，Alwine 等人将此印渍术应用于 RNA 的研究上，并首先采用重氮苄氧甲基纤维素纸 (Diazobenzyl oxymethyl cellulose paper, 简称 DBM)，以使被印渍物和它共价键合而被固定化^[19]。遗憾的是，Alwine 等

人把当时人们以发明人姓氏命名的 Southern blotting, 以其姓氏含南部之意来称呼(即南部印渍术), 而把他们的改良法风趣地称为北部印渍术(Northern blotting)。1979年, Towbin 等人首先把印渍术用于抗原检出, 并称为免疫印渍术(Immunoblotting)^[20]。Towbin 等人另一功绩是, 他们首先应用电洗脱装置作为印渍动力, 这不仅能真实地获得凝胶分离区带的复制品, 而且缩短了印渍时间^[20]。目前, 用电作为印渍动力的方法是最广泛应用的一种, 且已有几种仍不太理想的电印渍专用装置问世, 如美国 Bio-Rad 公司生产的 Transblot cell; 我国江苏兴化分析仪器厂生产的转移电泳槽。此外, 人们也常把用电作为印渍动力的印渍术称为电印渍 (Electroblotting)^[21]、电洗脱法 (Electroelution)^[22]、电转移 (Electrotransfer)^[23]、电泳转移 (Electrophoretic transfer)^[24]、横向电泳 (Transversal electrophoresis)^[25]等。Towbin 等人创造的免疫印渍术是当代印渍术中发展最快、应用最广的一类, 目前已有不少用于临床诊断的报道^[26~28]。这是因为抗体也是大分子, 它们不易渗入凝胶, 用凝胶直接检出将有一定困难, 印渍术正好免除了这一关键问题^[29]。1981年 Burnette 把免疫印渍术谐称为西部印渍术 (Western blotting)^[30], 并为许多人所接受而沿用至今, 成为免疫印渍术的同义词^[31]。蛋白质印渍术最初系由 Renart 等人提出的^[32]。1982年, Reinhart 和 Malamud 将等电点聚焦法分离蛋白质的凝胶作为印渍模板, 他们又把这种蛋白质印渍术称为东部印渍术 (Eastern blotting)^[33], 使之成为蛋白质印渍术的同义词。

综上所述, 除了 Southern blotting 系取发明人姓氏以示纪念外, 其余名称均属科学上诙谐之称, 虽说别有风趣, 但其后果除造成名称的混乱外, 还出现了不必要的政治性争论^[34]。于

是, Gershoni 和 Palade 在 1983 年著文呼吁改变这一局面, 并建议把各种生物大分子从凝胶转移到一种固定化基质上的过程称为印渍术 (blotting), 这一术语可和有关大分子连在一起使用, 如 DNA 印渍术 (DNA blotting)、RNA 印渍术 (RNA blotting)、免疫印渍术 (Immunoblotting)、蛋白质印渍术 (Protein blotting) 等^[39]。就目前报道的文献看, Gershoni 和 Palade 的建议已为大多数学者所接受, 迄今, 除了 Southern blotting 和 Western blotting 外, 像 Eastern blotting 和 Northern blotting 等以地区性命名的术语已基本消失。但是, Gershoni 和 Palade 关于 Blotting 可与有关大分子名称连用的建议, 又引起了另一堆名词。如大分子印渍术 (Macromolecular blotting)^[35]、酶印渍术 (Enzyme blotting)^[36]、脂多糖印渍术 (“LPS” blotting)^[37]、配体印渍术 (Ligand Blotting)^[38]、酶联免疫电转移印渍技术 (Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques)^[39]、麦胚凝集素印渍术 (Wheat Germ agglutinin blotting)^[40]、金印渍术 (Golden blotting)^[41]、过氧化物酶免疫印渍术 (Peroxidase immunoblotting)^[42] 等等。显然, 除了前三个词符合 Gershoni 和 Palade 的建议外, 其余名称实属印渍过程中用于检出所使用的配体或染料名称, 非并 Gershoni 和 Palade 所建议的, 原来存在于凝胶中, 后被印渍于固定化介质上欲检出的生物大分子。

值得提出的是, 1979 年 Renart 等人^[39]在进行蛋白质印渍研究中为了研究印渍效率, 他们把蛋白质纯品直接点于固定化纸上, 然后再按印渍术的其后步骤予以鉴定。同年, Cleveland 等人^[43]把疱疹病毒感染的细胞直接点于固定化材料上使之固定化, 然后进行免疫检出。这种不经凝胶电泳分离, 直接把样品以小圆点或其它几何形状 (如小方块^[44]) 点于固定化材料, 然后

再用分子亲和技术检出的方法现在称为点印渍术 (Dot blotting)^[45]。也就是说,点印渍术除省略了凝胶电泳外,其它步骤则和印渍术相同。因此严格说来,点印渍术似不应列入本技术范畴。但是,考虑到两种方法具有相辅相成的关系,作者将把它作为印渍术的一项分支来讨论。

点印渍术 (Dot blotting) 是在 1981 年,因 Larsson 设计了一种纸上肽抗原的多点测定法 (Multi-spot test)^[46] 而引起人们注意。自此以后,点印渍术则以其同时可检出数十样品而闻名于世。报道之多,发展之快,都达到惊人的程度^[39],各种点印渍专用装置也相继问世。例如, Towbin 小组设计了一种可注射皮克量的样品输送器 (Hami-Lton Microlad M 型),能反复输送 $0.1\mu\text{l}$ 体积的样品,并使其自动地点在刻有格子的 NO 纸上。又如, Alric 等人^[44]设计了一种点印渍槽,一次操作可上样 600 个。当然,也像其它新技术出现时的情景那样,点印渍术的名称也有许多同义词,尤其是因为它广泛用于抗原和杂交瘤的筛选,故常冠以有关名词。例如,点免疫结合术 (Dot immunobinding)^[39]、斑点免疫检出法 (Spot immunodetection)^[47]、点印渍免疫测定 (Dot blot immunoassay)^[48]、抗原斑点检出法 (Antigen spot detection)^[49]、杂交斑点分析 (Hybridot analysis)^[50] 等。近来更有人把细胞直接点于固定化纸上的点印渍术,并称为群体印渍 (Colony-blot)^[42]。

图 1-2 列出了通规印渍术和点印渍术所得检出图谱,据此不难判别二者之差异。图中, A 为限制性内切酶降解人 DNA 所得片段经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后,凝胶的放射自显影谱 (其中列 1 为 λ DNA 的分子量标准系列); B 是该凝胶经用 NO 纸印渍,并用 β 珠蛋白的 RNA 与之杂交后所得的放射自显影谱; C 是以圆点的形式直接把不同量胸苷酸激酶点于 DE81 纸上,

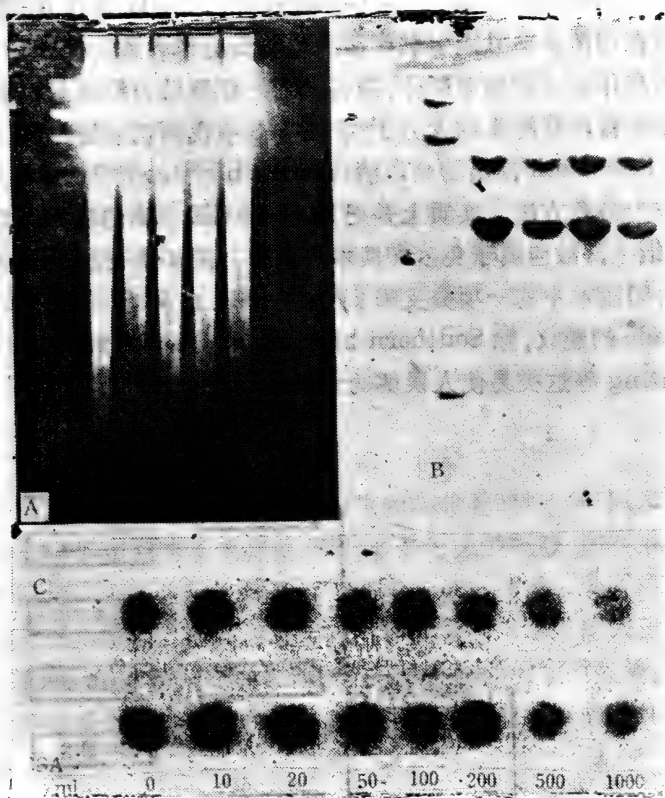


图 1-2 以凝胶为模板的常规印渍术(A、B)和点印渍术(C)的印渍谱比较
A, 经限制酶切人 DNA 的电泳凝胶之放射自显影谱; B, 此凝胶
经印渍, 并用分子杂交检出专一性区带的放射自显影谱; C, 直接
点样于固定化纸的点印渍谱, 数字示点样 $45 \mu\text{l}$ 胸苷酸激酶所含
牛血清蛋白(BSA)的浓度。

然后用 ^{125}IdU 检出的放射自显影点印渍谱。

综上所述, 作者按 Gershoni 和 Palade 的建议^[2], 把各种印渍术归类如图 1-3。正如 Gershoni 和 Palade 提出的那样, 要求在印渍术前只冠以被印渍的生物大分子名称。至于目前常见的在印渍术前加有配体、染料、装置、印渍动力等等名称者, 也可按照被印渍的生物大分子, 在图 1-3 中找到相应的位置。例如 Brada 和 Roth 提出的金印渍 (Golden blotting)^[41], 金溶胶只是作为染色方法, 实质上是把 SDS-PAGE 分离的抗原印渍于 NC 纸上, 故应属于免疫印渍术。此外, 图 1-3 也把点印渍术作为印渍术中的一项分支来归类。作者也同意 Gershoni 和 Palade 的建议, 除 Southern blotting 外, 不再使用如 Eastern blotting 等这类易使人误解的地区性名称。

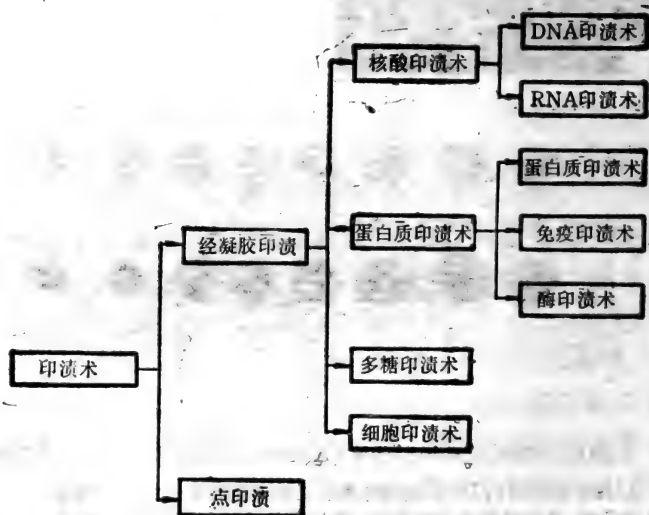


图 1-3 作者建议的印渍术分类

三、印渍过程及常用术语

要熟悉并掌握一项新技术,必须先对其全过程有一初步了解,以便在此基础上领会其有关理论。图 1-1 曾列出了 DNA 印渍术的概貌,这里再以 Gershoni 等人最近用免疫印渍术特异检出人红细胞膜中副流感病毒受体(sendai virus receptors)的全过程作为例子^[51],并同时介绍印渍过程中常用的术语。

图 1-4 系 Gershoni 等人实验步骤的方框图。为了比较检出效率,他们同时用放射标记法和酶联免疫检出法进行检出。此外,他们的这一实验比较完整,在引用时,因不同的实验目的可以删减。但图中标有数码的步骤,除猝灭项外通常是不能减少的。

1. 凝胶电泳

印渍术中进行的凝胶电泳与常规法并无两样,但因印渍效果和凝胶的孔径与厚度有关,而大多采用板型凝胶。即使采用圆型管凝胶,也往往经纵切后取中间片条进行印渍。为了使大分子容易迁出凝胶,常在不影响分辨率的情况下尽可能采用大孔胶。此外,在一些研究印渍机理及其影响因素的印渍实验中,为使结果标准化,大多采用著名的、久经考验而公认的 Laemmli 电泳系统^[52]。

在图 1-4 所示实验中, Gershoni 等人也用 Laemmli 系统对人红细胞影淘(影泡制法可参考文献[43]和[54])进行板型十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。上样量为 70~100 μg 影淘,凝胶浓度为 10%,板胶厚 0.3~1 mm。电泳后凝胶纵切为三:一块作常规染色,用它和印渍后的考贝相对照,了解印渍区带数是否和原来凝胶中相同;另两块用作比较两种

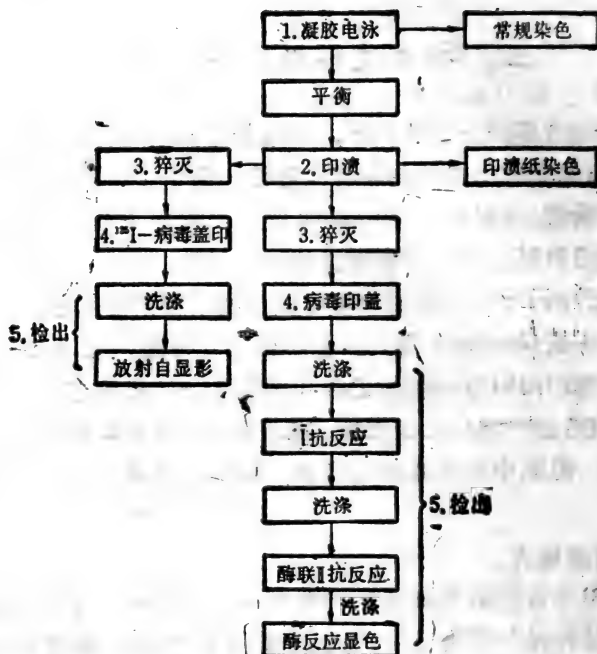


图 1-4 用免疫印渍术特异性检出人红细胞膜中副流感病毒受体的全过程示意图(说明见正文)

检出方法的印渍模板(Blot templet), 故同时放在印渍缓冲液 [15.6mM Tris, 120mM 甘油, pH 8.3; 加(或不加)20% 甲醇] 中, 在室温下浸泡 1~4 小时。此步称为印渍前平衡, 目的在于防止凝胶从电泳缓冲液转入印渍缓冲液时, 因盐浓度改变而使凝胶胀或缩, 致使印渍谱上区带扭曲变形造成的影响。

2. 印渍

印渍(Blot)或称转移(Transfer), 实质上是把凝胶电泳已分离的区带转移于固定化纸或膜使之固定化。这种固定化作用可以是非共价结合(如用 NO 纸), 也可以是共价结合(如用重

氮化纸)。印渍的动力既可用电,也可利用毛细作用,接触扩散作用。为此印渍术中又可按印渍动力分为电印渍术(Electroblotting)、毛细作用印渍(capillary blotting)和接触扩散印渍(contact diffusion)^[56]。所用印渍装置一般由实验自行设计,图1-5所示电印渍装置示意图是比较通用的。也就是说,在两侧装有网板形正、负电极的印渍槽中央,放入印渍夹层。此夹层常由多孔有机玻璃板、泡沫塑料垫、一叠滤纸、固定化纸、凝胶等所组成。因将在第三章中,专门讨论,这里不再详述。

在 Gershoni 等人的实验中采用自行设计的,与图1-5类似的电印渍装置。印渍纸是 NC, 印渍电压为 70~90V, 印渍时间 3~6h。所用印渍缓冲液和上述平衡溶液相同,用量为 4l, 同时预冷到 8~10°C。

3. 猝灭

猝灭(Quenching)又称封阻(Blocking)。因为印渍术的重要目的在于检出某种已分离的功能性区带,而不是全谱的检出,这就要采用生物分子亲和技术。也即利用一对亲和物中的甲方去检出已被印渍于固定化纸(称印渍纸)上的乙方。由于甲方仍是生物分子,直接用它去处理已印渍的固定化纸,它势必去占领印渍纸上各区带间所剩余的活性基团,使它也被固定化,从而使欲检出的区带混淆不清,难以辨认。为此必须把印渍纸上这些剩余的活性基团事先封闭再行检出。印渍术中这种和印渍纸剩余

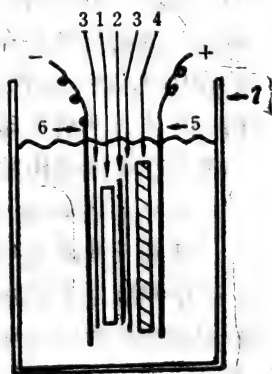


图1-5 电印渍装置示意图

1. 凝胶模板; 2. 固定化纸; 3. 一〇通用滤纸; 4. 泡沫塑料垫; 5. 铂丝网阳电极; 6. 多孔不锈钢片阴电极; 7. 有机玻璃印渍槽。

基团的结合称为非特异性背景结合 (Nonspecific background binding), 并把它比拟为“噪声”, 而把亲和物双方在印渍纸上的结合称为特异性结合 (Specific binding), 又比拟为“信号”。因此在印渍术中常用称为“信号-噪声比 (Signal-to-noise ratio)”的大小来表示所得印渍谱上背景的高低, 并把检出前预先封闭印渍纸上剩余基团的步骤称为猝灭或封阻, 所用试剂也相应地称为猝灭剂 (Quencher) 或封阻剂 (Blocking agent)。

在图 1-4 所示 Gershoni 等人的实验中系用牛血清白蛋白 (BSA) 和新生牛血清作为封阻剂。他们把上述印渍两条凝胶所得的两张印渍纸分别用含 2% BSA 的 PBS (硫酸盐缓冲的生理盐水, 即 140 mM NaCl, 10 mM 磷酸钠, pH 7.4) 溶液, 和含 3% BSA + 10% 新生牛血清的 PBS 溶液, 在 25°C 下浸泡印渍物 1~2h。前者用于放射性检出, 后者用于酶联免疫检出。

4. 印盖与检出

印渍于固定化纸上的生物分子区带, 固然也可用常规染料。如考罗斯亮蓝、氨基黑等使其显现全谱, 但印渍术的主要目的还在于利用生物分子的亲和性, 使印渍纸上我们感兴趣的某种或某些区带特异性地显现出来。这种利用亲和分子偶中一方去亲和结合印渍纸上另一方的处理, 印渍术上称为 Overlay。为了能和印渍术这一名词相呼应, 作者把含有覆盖物之意的 Overlay 译为“印盖”。印渍术中, 人们常按所用配体的类别冠以印盖名称, 如抗体印盖 (Antibody overlay)^[21]; 外源凝集素印盖 (lectin overlay)^[40]; 病毒印盖 (Virus overlay)^[51]; 钙调蛋白印盖 (Calmodulin overlay)^[57] 等。

在生物分子亲和技术中, 人们常把亲和分子偶中作为探测工具的一方称为配体 (Ligand)。它可以是生物大分子, 如 RNA、cDNA、蛋白质、抗体、外源凝集素等; 也可以是小分子, 如酶的

底物或其竞争抑制剂等。在印渍术中,配体既然作为探测工具,它必须在和其亲和物结合后能显现出来。为此人们常用化学修饰法(如用同位素、荧光化物或者酶联)使之直接或间接地标记。这种经化学修饰而打上标记的配体,印渍术中称之为探针(Probe)。由于印渍术中可以选用一些能发生共价反应的固定化用纸(如重氮纸)来印渍,所以凝胶电泳分离的大分子区带在印渍时能发生共价反应而牢固地结合于纸上。又由于用探针的印盖常是非共价结合,因此可在第一次探测并照相记录后,又可通过改变 pH 或离子强度来除去探针,然后再用另一种探针去探查另一些印渍物。这样继续下去,就可在一张印渍纸上实现多种探测^[58]。据此,印渍术中又按探针应用的先后顺序,分别称为第一探针、第二探针、第三探针等。并把除去前面探针的步骤称为抹除(Erasing)。

在图 1-4 所示实验中, Gershoni 等人^[52]采用病毒印盖。为了比较两种检出方法,他们同时采用了同位素标记法和酶联免疫检出法。由于方法不同,反应体系也不相同,故从猝灭步骤开始就分别进行了。就同位素标记法而言,他们把副流感病毒按 Markwell 和 Fox 法^[59],使用 Na^{125}I 使之碘化,然后用猝灭缓冲液(即 2% BSA 的 PBS 缓冲液)配成内含 ^{125}I -标记副流感病毒 $10\sim 20\mu\text{g}$ (相当于 $5\sim 10\times 10^5\text{cpm}$)的印盖液,于 4°C 下对印渍纸摇荡反应 2 小时,使病毒和其印渍纸上的受体特异性亲和结合。反应毕,用不含放射性的同种猝灭缓冲液洗涤 5 次,每次 10 分钟。印渍术中常简略写为“洗 5×10 ”。最后在专用装置中于 -70°C 下进行放射自显影 $12\sim 96$ 小时。所得放射自显影谱表明,仅有红细胞膜中所含的血型糖蛋白 A (Glycophorin A) 和副流感病毒亲和结合,由此得出结论:“它是红细胞膜上该病毒的唯一受体蛋白”。

关于酶联抗体检出法, Gershoni 等人系采用双抗体间接免疫显色的方法(图 1-4)。首先把 $150\mu\text{g}$ 的副流感病毒悬浮于 15ml 猝灭缓冲液(即含 3% BSA 和 10% 新生牛血清的 PBS 缓冲液)中,用它浸没印渍纸,并于 25°C 下振摇 2 小时,此即病毒印盖步骤。然后用 PBS 缓冲液洗印渍纸 5 次,每次 15 分钟,以除去未结合之病毒。用重组病毒被膜注射兔子得到的兔抗副流感病毒抗体^[60]作为 I 抗。此时, $150\mu\text{g}$ I 抗用 15ml 由 50mM Tris-HCl(pH 7.6)、0.05% Tween 20 和 3% BSA 组成的 I 抗反应液浸泡上述经印盖的印渍纸 1 小时,然后用不含 I 抗的同种缓冲液洗 4 次,每次 15 分钟以除去未结合之 I 抗。其后再用已经偶联着辣根过氧化物酶的羊抗兔 IgG 这种市售商品作为 II 抗。此时先把 II 抗以 1:1000 稀释度混入 15ml , 内含 3% BSA 的 PBS 缓冲液中,再用它浸泡已和 I 抗反应过的上述印渍纸 1 小时。用不含 II 抗的同种缓冲液洗 4 次,每次 15 分钟除去未反应 II 抗。此时即可加入辣根过氧化物酶的底物和显色剂,即用内含 25mg 二氨基联苯胺和 0.003% $\text{H}_2\text{O}_2(\text{v/v})$ 的 50ml , 50mM Tris-HCl(pH 8.6) 的缓冲液使印渍物保温显色。结果表明副流感病毒也只和红细胞膜中的血型糖蛋白 A 或其二聚体结合。

比较图 1-1 和图 1-4 的印渍过程,我们不难看出,生物大分子印渍术均包含有凝胶电泳、印渍、猝灭、印盖和检出这五大步骤。由于各步骤的反应体系不同,步骤之间增加了平衡洗涤过程。

四、印渍术的评价

Towbin 和 Gordon 指出,生物大分子印渍术使高分辨率的

凝胶电泳和高灵敏度的固相检出法结合起来,不但使操作简化、省时,且能达到更高的灵敏度^[29]。Flanagan 和 Yost 比较了用凝胶直接印盖检出和用印渍术检出钙调蛋白结合蛋白质(Calmodulin-binding proteins)后指出^[57],由于凝胶分离区带难以扩散迁出,故用凝胶直接检出,全程需 2~3 天,还随时要耽心凝胶在处理中可能出现的破损和断裂;相反用印渍术检出,全程仅需 16 小时,而分辨率和灵敏度都和凝胶直接印盖法相同。迄今,许多实验都证明印渍术有许多优点,归纳起来至少有如下十项:

(1) 湿的固定化用纸是柔韧的,容易操纵和控制。它经得起反复处理和连续分析,决不会像凝胶那样容易破损、断裂和变形。

(2) 被固定于固定化纸表面的生物大分子,可以均一地和各种配体起反应,它不会像凝胶那样因孔径位阻而妨碍配体分子和其亲和物接近。

(3) 印渍法使生物大分子浓集于固定化纸表面,不但使其检出所用配体的用量减少,而且改善了依据生物活性或抗原-抗体反应性的检出灵敏度。检出时间也大为缩短。

(4) 去除变性剂也比直接使用凝胶容易且彻底,能使生物大分子较完全地恢复到天然态。

(5) 对免疫印渍术而言,由于抗原已被固定化于印渍纸上,故可检出那些不会产生沉淀反应的抗原-抗体反应。

(6) 现在已能做到一次印渍可得多张复制品,例如 Manabe 等人的装置能在 1 小时内对一块凝胶模板印渍就可以获得 20 张考贝^[61],这样就能做多种鉴定与分析。

(7) 用共价键合法固定的生物分子,其探针可像录音磁带那样被抹除,然后再用第二、第三探针先后探查,这就可以回答某一区带是否具有多功能;某种抽提物有几种功能性生物分子

等问题。

(8) 生物分子被固定化后增加了稳定性, 印渍区带不会再扩散, 容易贮藏。不必像凝胶直接印盖那样必须马上连续不断地进行分析。

(9) 对同位素检出法而言, 由于固定化纸很薄, 可以提高放射自显影的效率; 尤其是低能量射线, 也能通过印渍术而获得较满意的结果。

(10) 印渍术所用设备简单, 可以自制。

印渍术仅有十二年历史, 但已显露出众多的优点, 而且还在不断地表现出来。例如 Thompson 等人利用印渍术同时测定大批样品中的酶活性^[35]; Parekh 等人指出印渍于 NO 纸上的蛋白质可以回收^[62]等等。当然, 印渍术也存在一定问题, 例如生物分子所以能印渍于 NO 纸的分子机制尚不十分清楚^[2, 29], DNA 印渍时必需使之变性为单链, 电印渍时最好采用和板型凝胶同样大小的整片状铂电极, 这是十分昂贵的, 现有的各种电极代用品都存在许多问题, 难以获得均一电场; 印渍纸的全谱染色尚局限于采用低灵敏度的染料, 如氨基黑 10B、考马斯亮蓝 R 250, 至于高灵敏度的银染料、印度墨水等还存在着高背景的问题; 由于各分离区带在同一条件下印渍, 在各种因素影响下常难以全部百分之百地转移于印渍纸, 因此定量检出的可行性尚视所需分离物的印渍性质而定。尽管如此, 这些还都是印渍术发展道路上出现的问题, 不是技术本身所存在的不可逾越的固有障碍。事实上许多问题已在解决之中, 例如 Taylor 已提出了印渍双链 DNA 的方法^[33]; Svoboda 等人采用氧化亚锡表面导电玻璃作为阳极, 以不锈钢板作为阴极, 创造了既能获得均一电场, 又防阳极表面氧化的电极系统^[35]; Brada 和 Roth 用金溶胶使印渍纸染色, 获得了低背景高灵敏度的染色谱^[41]。至于印渍定

量的改进方案更是层出不穷,除提出定量的实验依据外^[62],还创造了弱激光印渍纸定量扫描仪^[50]和电视-微机定量系统^[61]。可以相信,随着印渍术的高速发展必会不断完善,最终将成为生命学科许多领域中的常规技术。

五、印渍术的应用与前景

就目前已报道过的资料看,印渍术已在分子生物学和医学领域得到最多的应用,本书也将以一章篇幅予以较详细的阐述。为了能对印渍术的应用有一较全面的了解,这里将简要地介绍印渍术应用的各方面。

1. 在免疫学中的应用

印渍术是一种快速和灵敏的筛选抗原和抗血清的技术。和其它类似技术相比,它不需要对抗原或抗体进行预先提纯,也不一定对它们进行预先标记,可以直接用稀释过的抗血清得到免疫复合物。因此免疫印渍术常被用来作为抗原特性的描述;用于血清学上甄别目的^[20];鉴定抗体特异性;制备表位谱(Epitope mapping; Epitope 一词常译为抗原决定簇),分析非抗体配体类(Non-antibody ligands)对其受体的特异性结合。印渍术还能分析那些溶解度差的,在其它抗原-抗体沉淀反应中常以污染物出现的那些抗原。值得注意的是,免疫印渍术在鉴定肿瘤相关抗原(Tumor-associated antigen)中已证明是有效的^[64]。Rittenhouse 等人证明,广泛用于癌诊断和治疗中的癌胚抗原(Carcinoembryonic antigen),只能用免疫印渍术才能看出^[65]。此外,免疫印渍术也被用来检出免疫学上起交叉反应的蛋白质的电泳变异型(Electrophoretic variant),包括补体 C1g^[66]、次黄嘌呤核糖基转移酶^[67]、腺嘌呤磷酸核糖基转移酶^[68],以及低

密度脂蛋白受体^[69]。

2. 在医学领域的应用

印渍术可为诊断、治疗和了解疾病的病理,尤其是免疫病理,提供有力的工具。现在已使用印渍抗原来测定各种病人的抗体谱;已有可能直接用免疫印渍术作为临床检验的手段。Kettis 等人曾证明免疫印渍术能对痢疾阿米巴(*Entamoeba histolytica*)作出血清学上的应答,认为他能作为肠外传染病的血清诊断^[70]Towbin 等人曾用印渍术筛选自身免疫疾病的抗血清^[90]。有关蠕虫传染的免疫应答,因其复杂性和难以获取增溶了的抗原制剂,对它的研究过去是相当困难的,现在, Tsang 等人已用印渍术克服了这些问题,为这类传染病的早期诊断制备了抗原或特异性抗体^[26, 39]。Partanen 等人^[71]和 Sharma 等人^[72]都系统研究过弓形体病(*Toxoplasmosis*)免疫应答中的血清学图谱,认为印渍术所显示的这些肽类的免疫应答可用作弓形体病的诊断。Wise 和 Watson 开发了一类用于支原体感染免疫诊断的单克隆抗体探针^[73]。Barbour 等人用免疫印渍术阐明蜱(壁虱)对螺旋体传染负有责任的病原学根据,因为存在于病人的抗原和蜱中分离出的螺旋体之间显示出抗原同一性^[74]。Meleion 等人在单克隆伽吗疗法(*Monoclonal gamma-pathy*)中,应用印渍术鉴定尿中未提纯的骨髓瘤蛋白质。还有许多有关印渍术在医学领域的应用,将在后面专章介绍。

3. 在分子生物学领域的应用

Southern 初创印渍术时,就是为了研究核糖体 RNA (rRNA)的基因编码^[1]。Chambon 小组用互补 DNA (cDNA)探查小鸡卵清蛋白基因结构时发现,当小鸡基因组 DNA 经限制酶消化并印渍于 NC 纸,再用卵清蛋白 cDNA 探针与印渍纸中区带杂交时,放射自显影谱上显现出几条区带。他们立即意

识到卵清蛋白基因必定是被另一些 DNA 序列间隔开来, 这种间隔序列不被转录为卵清蛋白的 mRNA^[18], 这就动摇了原来认为: “核苷酸的线性序列直接相应于蛋白质中氨基酸的线性序列”这一概念。也就是说, “同线性原则”并不存在于真核生物中。用印渍术得到的这一重大发现, 也使它成为当今研究基因结构与表达的重要工具之一。现在常用印渍术来探测某种基因是否属断裂基因, 这种断裂基因含多少内含子等。

印渍术在分析 DNA 甲基化对基因表达有何作用中也提供了一种有用的信息。在高等真核生物的 DNA 中, 部分胞苷残基已被甲基化, 基因中的甲基化程度可用印渍术来分析。因为限制性内切酶 *Msp*I 和 *Hpa*II 的切点均在 CCGG 序列处, 如果此序列中胞苷被甲基化, 即 Cm^5CGG 时, *Hpa*II 就不能识别, 而 *Msp*I 仍能切割。因此对同种基因的 *Hpa*II 和 *Msp*I 酶切印渍谱进行比较就能反映出该基因的甲基化程度。现已确定, 基因的甲基化程度与其转录活性成反比^[76]。

印渍术又可用于基因活化的研究。已经知道, 在某种特定组织中被转录的基因要比不活动的基因能更快地被 DNase 降解。印渍术对这种优先降解作用的分析提供了优良的工具。细胞核用 DNase I 消化, 然后抽提出 DNA, 经限制性内切酶消化后进行电泳, 再印渍于 NC 纸, 并用特定基因探针检测。因为含有该探针特异性的限制酶切片段可被 DNase I 预先降解而消失, 故此实验就能反映该基因对此酶的敏感程度^[77]。显然, 这种印渍检验可用于机体不同组织或不同发育阶段某些基因的活性比较。

印渍术也被用于各种遗传疾病中功能畸变基因 (Malfunctioning gene) 的分析。如像地中海贫血症和镰形红细胞贫血症都曾用印渍术分析过。在患有 β -地中海贫血症的病人中, β -珠

蛋白链的合成下降,但 β -珠蛋白基因的限制酶切图谱显示的基因结构几乎总是完整的。相反,在 α -地中海贫血症中通常检出的则是 α -珠蛋白。

4. 印渍术在生物化学领域的应用

印渍术被广泛用于各种生物分子间的相互作用。例如 Bowen 等人^[78]和 Hoch^[79]用印渍术研究过 DNA-蛋白质和 RNA-蛋白质的相互作用; Bowen 等人^[78]还研究过组蛋白 H2, H3 和 H4 之间的相互作用。Fernandez-Pol^[80]用表皮生长因子激素鉴定出印渍谱上的表皮生长因子受体。Gershoni 等人用 α -金环蛇毒印盖电鳗电器官膜的印渍谱,发现此毒素只和乙酰胆碱受体的 α -亚单位结合。Bell 和 Engvall 用印渍术找到了胶原和纤维粘连蛋白(Fibronectin)的结合片段^[81]。Erlieh 等人用印渍术分析了外源凝集素与糖蛋白之间的相互作用^[82]。Gorelick 等人则用印渍术查证了钙调蛋白与其结合蛋白间的结合^[83]。此外,印渍术也在酶亚单位的鉴定中发挥作用^[84],甚至有人用印渍术来测定酶活性。近来,Thompson 等人提出了测定大批样品中谷氨酸合成酶(EC 1.4.7.1)和谷氨酰胺酶(EC 3.5.1.2)酶活性的印渍方法^[85]。Kuonen 等人也创造了用印渍术测定牛心线粒体内膜中琥珀酸脱氢酶的酶活性^[86]。印渍术还能鉴定质膜的表面成分及其拓扑学^[86];分析同工酶^[50]等。

5. 印渍术在生命学科其它领域中的应用

印渍术已在细胞生物学中开始应用,例如 Hayman 等人^[87]将人血清进行凝胶电泳并印渍于 NC 纸后,用正常鼠肾细胞(NRK 细胞株)一起保温,发现印渍纸上某些区带能和 NRK 细胞亲和结合。经染色,发现正常的 NRK 细胞被定位于纤维粘连蛋白(Fibronectin)和一种新发现的分子量为 70000 道尔顿的多肽上。这一工作开创了用印渍术研究蛋白质与细胞间相互

作用的新领域。印渍术也在植物生理学方面开始应用。Steup和Gerbling用印渍术分析了菠菜和豌豆叶抽提液中葡聚糖水解酶类的多态性^[88]。在生物物理学方面, Erickson等人^[58]发现把¹⁴C-或³⁵S-标记多肽从凝胶转移于固定化纸上,能增大用放射性自显影检出的效率,认为这是由于缩短了放射性同位素和照片乳胶表面之间的距离而引起的,也因为干的印渍纸比湿的凝胶片对同位素显影有更大的灵敏度所致。

印渍术已证明是一种具有广泛应用的优良技术,新的应用还在不断开发。例如已有研究表明,印渍纸上的固定化生物分子在原位被修饰是可能的。把印渍纸用唾液酸酶保温可以从糖蛋白区带上除去唾液酸残基。印渍纸上磷酸化了的蛋白质也可以用碱性磷酸酶进行原位去磷酸化。显然,这种原位修饰对研究生物分子识别则是重要的。印渍纸上的生物分子也容易复性,这种复性了的固定化区带用来充当活体外重组研究中成核现象的位点也许是有可能的。

参 考 文 献

- [1] Southern, E. M., J. Mol. Biol., 98: 503, 1975.
- [2] Gershoni, J. M. and G. E. Palade, Anal. Biochem., 131: 1, 1983.
- [3] 范培昌,生物化学与生物物理进展, 5: 2, 1986.
- [4] 赵永芳和朱勤,同上, 5: 75, 1986.
- [5] 北京大学生物系遗传教研室编,遗传学实验方法和技术,高等教育出版社, p.98, 1984.
- [6] O'Farrell, P. H., J. Biol. Chem., 250: 4007, 1975.
- [7] Sims, M., Nature, 207: 757, 1965.
- [8] Adair, S. W. et al., J. Cell Biol., 79: 281, 1978.
- [9] Roslas, J. A. P. et al., Anal. Biochem., 80: 366, 1977.
- [10] Rilch, P. F. and M. P. Ozech, J. Biol. Chem., 255: 1722, 1980.
- [11] Breahtnach, R. et al., Nature, 270: 314, 1977.
- [12] Fuller, R. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 7370, 1981.

- [13] Zimmerman, S. B. and B. H. Pfeiffer, *ibid.*, 80: 5832, 1983.
- [14] Pfeiffer, B. H. and S. B. Zimmerman, *Nucleic Acid Res.*, 11: 7853, 1983.
- [15] Massague, J. et al., *J. Biol. Chem.*, 256: 9419, 1981.
- [16] Carlin, R. K. et al., *J. Cell Biol.*, 89: 449, 1981.
- [17] Mathew, C. G. P., in *Techniques in Molecular Biology* (Walker, J. M. and W. Gaastra, eds), pp. 273~285, Croom Held Ltd., London, 1983.
- [18] Breathnach, R. et al., *Nature*, 270: 314, 1977.
- [19] Alwine, J. C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3116, 1977.
- [20] Towbin, H. et al., *ibid.*, 76: 4350, 1979.
- [21] Carlone, G. M. et al., *Anal. Biochem.*, 155: 89, 1986.
- [22] Kittler, J. M. et al., *ibid.*, 137: 210, 1984.
- [23] Aubertin, A. M. et al., *ibid.*, 131: 127, 1983.
- [24] Stott, D. I. et al., *ibid.*, 149: 454, 1985.
- [25] Svoboda, M. et al., *ibid.*, 151: 16, 1985.
- [26] Tsang, V. C. W. et al., *J. Parasitol.*, 68: 1084, 1982.
- [27] Takahashi, K. et al., *Cancer Res. Clin. Oncol.*, 105: 67, 1983.
- [28] Wilson, J. M. et al., *J. Clin. Invest.*, 69: 706, 1982.
- [29] Towbin, H. and J. Gordon, *J. Immunol. Methods*, 72: 313, 1984.
- [30] Burnett, W. N., *Anal. Biochem.*, 112: 195, 1981.
- [31] Theisen, N. et al., *ibid.*, 148: 288, 1985.
- [32] Reinhart, M. P. and D. Malamud, *ibid.*, 123: 229, 1982.
- [33] Renart, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350, 1979.
- [34] Peferoen, M. et al., *FEBS Lett.*, 145: 369, 1982.
- [35] Thompson, G. A. et al., *Anal. Biochem.*, 148: 288, 1985.
- [36] van der Berg, K. *Anal. Biochem.*, 155: 149, 1986.
- [37] Bradbury, W. C. et al., *ibid.*, 137: 129, 1984.
- [38] Cardin, A. D. et al., *ibid.*, 137: 368, 1984.
- [39] Tsang, V. C. W. et al., *ibid.*, 143: 304, 1984.
- [40] Bartles, J. R. and A. L. Hubbard, *ibid.*, 140: 284, 1984.
- [41] Brada, D. and J. Roth, *ibid.*, 142: 79, 1984.
- [42] De Blas, A. L. and H. M. Cherwinski, *ibid.*, 133: 214, 1983.
- [43] Cleveland, P. H. et al., *J. Immunol. Methods*, 29: 369, 1979.
- [44] Alric, M. et al., *Anal. Biochem.*, 155: 328, 1986.
- [45] Hsu, Y-H, *ibid.*, 142: 221, 1984.

- [46] Larsson, L. I., *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 408, 1981.
- [47] Huet, J. et al., *J. Biol. Chem.*, 257: 2613, 1982.
- [48] Yen, T. S. B. and R. E. Webster, *Cell*, 29: 337, 1982.
- [49] Herbrink, P. et al., *J. Immunol. Methods*, 48: 293, 1982.
- [50] Domin, B. A. et al., *Anal. Biochem.*, 136: 390, 1984.
- [51] Gershoni, J. M. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 856: 19, 1986.
- [52] Laemmli, U. K., *Nature*, 227: 680, 1970.
- [53] 范培昌等, *生物化学杂志*, 1(1): 37, 1985.
- [54] 范培昌等, *生物化学与生物物理学报*, 18: 349, 1986.
- [55] Gershoni, J. M. et al., *Anal. Biochem.*, 124: 396, 1982.
- [56] Gooderham, K., in *Techniques in Molecular Biology* (Walker, J. M. and W. Gaastra, eds.), pp. 49~61, Croom Helm, London, 1983.
- [57] Flanagan, S. D. and Yost, B., *Anal. Biochem.*, 140: 510, 1984.
- [58] Erickson, P. F. et al., *J. Immunol. Methods*, 51: 241, 1982.
- [59] Markwell, M. A. K. and C. F. Fox, *Biochemistry*, 17: 4807, 1978.
- [60] Volsky, D. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5440, 1979.
- [61] Manabe, T. et al., *Anal. Biochem.*, 143: 39, 1984.
- [62] Parekh, B. S. et al., *ibid.*, 148: 87, 1985.
- [63] Taylor, G. R., *ibid.*, 148: 524, 1985.
- [64] Rosen, S. T. et al., *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 13: 173, 1983.
- [65] Rittenhouse, H. G., et al., *Prot. Biol. Fluids*, 31: 937, 1984.
- [66] Chapuis, R. M. et al., *J. Immunol.*, 129: 1509, 1982.
- [67] Wilson, J. M. et al., *J. Biol. Chem.*, 257: 1508, 1982.
- [68] Wilson, J. M. et al., *J. Clin. Invest.*, 69: 706, 1982.
- [69] Beisiegel, U. et al., *J. Biol. Chem.*, 257: 13150, 1982.
- [70] Kettis, A. A. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 512, 1983.
- [71] Partanen, P. et al., *FEBS Lett.*, 158: 252, 1983.
- [72] Sharma, S. D. et al., *J. Immunol.*, 131: 977, 1983.
- [73] Wise, K. S. and R. K. Watson, *Infect. Immun.*, 41: 1332, 1983.
- [74] Barbour, A. G. et al., *ibid.*, 41: 795, 1983.
- [75] Melcion, C. et al., in *Immunoenzymatic Techniques* (Avrameas, S. et al. eds.), Elsevier, Amsterdam, P. 337, 1983.
- [76] Ehrlich, M. and R. Wang, *Science*, 212: 1350, 1981.
- [77] Stalder, J. et al., *Cell*, 19: 973, 1980.
- [78] Bowen, B. et al., *Nucl. Acids Res.*, 8: 1, 1980.

- [79] Hoch, S. O., Biochem. Biophys. Res. Commun., 106: 1353, 1982.
- [80] Fernander-Pol, J. A., FEBS Lett, 143: 86, 1982.
- [81] Bell, B. L. and E. Engvall., Anal. Biochem., 123: 329, 1982.
- [82] Erlich, H. A. et al., J. Biol. Chem., 254: 12240, 1979.
- [83] Gorelick, F. S. et al., J. Cell Biol., 95: 401a, 1982.
- [84] Mailerman, H. G. et al., Anal. Biochem., 120: 46, 1982.
- [85] Kuonen, D. R. et al., ibid., 153: 221, 1986.
- [86] Loeb, M. R., Anal. Biochem., 143: 196, 1984.
- [87] Hayman, E. G. et al., J. Cell Biol., 95: 20, 1982.
- [88] Steup, M. and K.-P. Gerbling, Anal. Biochem., 134: 96, 1983.

第二章 印渍术原理及其影响因素

第一章引言已说明,生物大分子印渍术实由凝胶电泳、生物分子固定化,以及生物分子原位亲和结合三项技术组合而成的综合性新技术。就印渍术的基本原理而论,它必然以此三项技术为依据,同时又因它们的组合而显现出特殊性,还有需要探讨的原理。限于篇幅,本章将只讨论与印渍术有关的基本原理,至于组成印渍术的这三类技术,它们的原理和方法可参阅有关专著^[1~4]。

需要提出的是,生物大分子印渍术仅有十二年历史。象其它新技术出现时的情景那样,报道大多集中在改进方法和应用开发等方面,有关技术原理的探讨还处在初始阶段,某些现象尚无肯定结论。这也许就是目前国内、外仅有数篇综述文章^[5~7],尚无专著问世的原因所在。尽管如此,为了促进本技术的发展,作者还是力图从如象潮水般涌来的有关印渍术的文献中,搜集并小结出某些理论。一些实难定论的现象也将以影响因素予以阐述。

一、印渍效率

前已提及,印渍术首先是把生物大分子从凝胶中转移到固定化纸或膜上使之固定化,然后就在固定化纸上进行固相检出。这样做不仅使印渍术获得了凝胶电泳所具有的高分辨率,也获

得了固相检出技术所具有的简化性和高灵敏度^[7]。显然,人们必然要求在印渍过程中所有已被电泳分离的生物分子,都能毫不保留地全部迁出凝胶,并毫无损失地印渍于固定化纸上。只有这样,印渍才符合定量的要求。然而这只是理想状态,事实上存在着许多限制因素(详见后述)而难以达到。为此,人们引入了称为印渍效率(Blotted efficiency),或称为转移效率(Efficiency of transfer)这一概念。其含义是,印渍后印渍纸上所得各复制区带的量(浓度)占原有凝胶中所具相应区带量(浓度)的百分数。

例如,Stott 等人^[8]为了确定印渍效率做了两项实验。第一项实验要求回答蛋白质能否从凝胶中均一地转移到 NO 纸上。为此他们把牛血清白蛋白以 $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 板状凝胶量,在凝胶聚合前就均匀地参入于丙烯酰胺溶液中。制板并聚合后,不经电泳就直接用电印渍法把蛋白质印渍于 NO 纸。最后用氨基黑把凝胶和 NO 纸分别染色,并用反射式光密度计对 NO 纸在 1cm 间隔距离下扫描,结果得图 2-1 扫描谱。他们计算了 10 次扫描的平均误差,证明除去边缘效应(Edge effect)外,每次扫描的最大平均误差是 $\pm 7.2\%$,整个面积的最大误差少于 9%。此后,他们再把这种已染色的 NO 纸和凝胶,分别切成 $2 \times 2\text{cm}$ 的平方小块,用甲醇: H_2O : 氨水(比重 0.880) = 66:34:1(v/v/v) 于 60°C 下保温 4 小时,再在室温下放三天,务使洗脱完全。然后在 610 nm 波长下测定洗脱液的 OD(光密度)值。与此同时,把一系列浓度的牛血清白蛋白标准溶液分别直接点在 NO 上,干燥后用上述同样方式染色和洗脱。测定表明,该标准溶液的 E_{610} 在 $10 \sim 100 \mu\text{g}$ 蛋白质量范围内呈线性;印渍过的凝胶中还残留有血清白蛋白 58%,而转移于印渍纸上的印渍效率为 42%。他们认为,如此低的印渍效率可能是由于凝胶中残留有难以迁

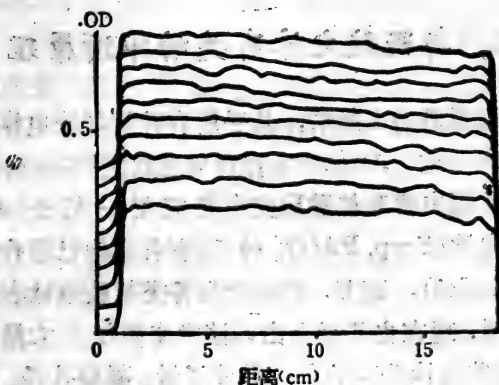


图 2-1 印渍有牛血清清蛋白的 NC 纸, 经氨基黑染色后的扫描谱
扫描间隔 1cm; 每次扫描之间的基线约升高 0.05OD。

出凝胶的聚合态血清白蛋白之缘故。

第二项实验要求回答经电泳分离后的印渍效率。此时, 他们把牛血清白蛋白和患骨髓瘤病人的血清混合进行凝胶电聚焦电泳分离, 然后电印渍于 NC 纸。凝胶和 NC 纸分别染色后, 切下各分离区带, 最后再按第一项实验所述方法洗脱并测 E_{610} 。结果表明牛和人的血清白蛋白平均印渍效率分别为 90% 和 82%; 骨髓瘤病人血清的印渍效率在 73~100% 之间, 不同分离区带并不相同, 平均为 89%。由此得出结论认为, 不同蛋白质的印渍效率是不一样的。

上述实例表明, 印渍效率是本技术的一项重要参数。尤其是想用印渍术进行定量分析时, 更需要设法使印渍效率尽可能达到 100%, 起码应使所需要的那条区带达到近似 100% 的印渍效率。现在已经知道, 影响印渍效率的因素很多, 必须对它们充分理解才能获得优良的印渍效率。

二、与凝胶电泳有关的印渍原理

就目前已报道的文献看, 几乎所有种类凝胶电泳后的凝胶都被成功地印渍过。Andrews 曾列出当代所用凝胶电泳的主要类型及其在蛋白质和核酸研究中的应用一览表(表 2-1)^[9], 其中除制备电泳(Prep. PAGE)外, 其它各类均已用作印渍模板(Blotted templet)。而且, 表中所列各类凝胶电泳在分离分析中的各项应用, 现在也几乎全由印渍术来担任。大量的印渍实践表明, 由凝胶电泳分离的各区带分子量、凝胶孔径、所用凝胶类型, 以及上样量都会影响印渍效率。

1. 分子量与印渍效率

通常认为, 凝胶电泳后因各生物大分子被限制在凝胶内, 分子量越大就越难扩散出凝胶, 因此印渍效率也较低。Bittner 等人^[10]用 *Hae* III 限制性内切酶, 把 ϕ X 174 DNA 切成长度为 72 到 1342 碱基对(bp)的片段, 并用 ^{32}P 予以放射性标记, 在 5% 聚丙烯酰胺凝胶(PAG)和 0.5% 琼脂糖(Ag.)中进行组合电泳分离后, 再电印渍于重氮苯氧甲基纤维素纸(Diazobenzyl oxymethyl cellulose paper, 简称 DBM 纸)上。最后分别对凝胶和印渍纸进行放射自显影, 拍照存底后再切下各区带进行放射性计数, 结果如表 2-2 所示。可见: (1)在一定的凝胶孔径下, 分子量越大印渍效率越差; (2)分子量越小越易扩散出凝胶, 因此残留在凝胶中的量极少(如表 2-2 中 72 核苷酸数者), 但其印渍效率并不理想, 表明部分小分子会穿透固定化纸进入印渍缓冲液中(见后面之论证); (3)印渍后把转移于固定化纸上的量和残留在凝胶内的量相加, 其和常常不能得到 100%, 说明除小分子穿透 NC 纸外, 印渍后处理也会造成一些损失。

Vaessen 等人^[11]用¹²⁵I 标记了酵母线粒体的细胞色素 bc_1 复合物, 经 SDS~11% PAG 板形电泳后用电印渍把分离区带印渍于两张叠放着的 NC 纸上(印渍 2 小时)。最后分别对凝胶模板和两张 NC 纸进行放射自显影, 所得显影谱分别在 550 nm 波长下用光密度计扫描, 并计算所得各亚单位区带之量, 结果如表 2-3 所示。可见, 有些蛋白质确会在印渍时穿透第一张固定化纸而印渍于第二张固定化纸上, 尤其是低分子量(<25000 Mr, Mr 为表观分子量)的蛋白质。其次, 表 2-3 也表明, 在此实验条件下印渍效率难达 100%。但也不能绝对地认为分子量越大印渍效率越差, 例如表 2-3 所列 40000 Mr 亚单位却是印渍效率最高的, 说明印渍效率还和蛋白质性质有关。

Manabe 等人^[12]为了验证: “一定凝胶孔径下分子量越大的生物分子印渍效率越差”这一概念, 进行了一项很有说服力的实验。他们把人血清进行二元电泳, 即先进行圆管形凝胶电聚焦, 然后把凝胶纵切, 取中间的胶片条放于线性浓度梯度板形凝胶(由 4~17% 丙烯酰胺和 0.2~0.85% 甲叉双丙烯酰胺聚合而成)顶部进行电泳。Manabe 等人设想, 采用梯度凝胶将使不同分子量的蛋白质都能处于与其大小相当的凝胶孔径中, 理应全部能有效地被印渍。Manabe 等人又考虑到印渍时间可能引起误差, 于是在电印渍时, 除了控制恒电流为 150 mA(起始电压为 12 V/cm)外, 每 10 分钟换一张新的 NC 纸, 直到 100 分钟, 共得 10 张考贝。图 2-2 系用考马斯亮蓝 R-250 对印渍前所用凝胶模板(A), 以及印渍后所得第 5(B)和第 10(C)张 NC 纸的染色谱。可见, 使用梯度凝胶可使各种分子量的蛋白质, 包括 5 万~100 万在内的所有蛋白质, 同时迁出凝胶并印渍于 NC 纸。但是, 较大分子量的蛋白质(分子量 >170000)需要更长的印渍时间(见图 2-2 之 O)。为了能定量地说明问题, Manabe 等人

表 2-1 凝胶电泳的主要类型及

物质	可解答的分离分析问题	PAGE HB	PAGE MPB	SDS- PAGE	PGGE
蛋白质类(包括糖蛋白与脂蛋白类)	未知混合物的分析	+	++	++	++
	未知物与已知物之比较	+	+	+	+
	复杂混合样品(如血、尿、脑脊髓液)组分比较		+		
	微量样品的定量分析				
	组蛋白及其它碱性蛋白质	+		+	
	膜蛋白	+	+	++	+
	均质性(即纯度)验证	+	+	+	+
	凝胶过滤或离子交换层析等分离物之检验	+	++	+	+
	某提纯法各步产率与纯度之检验	+	++	+	+
	作为进一步提纯之指示	+	+	++	+
	制备方面的应用				
	遗传物质或化学修饰研究中组分变异之检验	+	++		
	构象异构体、三级结构分析	+	++		
	缩合-分解反应	+	++		+
	配体结合检验	+	++		+
	亚单位结构分析	+		++	++
	分子量测定	+		++	++
	同工酶分析	+	++		++
	等电点测定				
	蛋白质混合物中糖蛋白之鉴定	+	+	+	
	脂蛋白分析	+	+		
核酸类	未知混合物分析	+	+		
	构象物分离	++			
	寡核苷酸分离	++			
	基因谱与指纹图谱分析	++	+		
	分子量测定	++			
	序列测定	++			

说明: PAGE HB, 使用均质缓冲液的 PAGE; PAGE MPB 使用多相缓冲系梯度凝胶电泳; Trans PGGE, 横向梯度凝胶电泳; 2D-PAGE, 双相电泳; Immuno, 免疫电泳; IEF dens. grad, 在具有密度梯度自由溶液泳; IEF gran. bed; 在水平式粒状凝胶中的电聚焦; SGE, 淀粉凝胶电泳; 异源凝集素存在下或用标记异源凝集素检出。

其在蛋白质与核酸研究中之应用

Trans PGGE	2D- PAGE	Prep. PAGE	Ag.& comp.	Imm- uno	EF dens. rgad	PAG- IF	NEP HGE	IEF gran. bed	SGE	AFE
+	+			++		++		+	+	
++			+	++		+		+		
	++			++		+				
				++		+				
				+		+	++			
++			+			+				
			+	+		+			+	
			+	+		+			+	
++			+			++				
		++			+		++			
					+	++			+	
++					+	+				
					+	+			+	
					+	++				++
					+	+				
				+		++			+	+
					++	++	+			
			++							
			++							
	+		+							
			++							

法的 PAGE; SDS-PAGE, 在 SDS 存在下的 PAGE; PGGE, 聚丙烯酰胺浓度 PAGE; Prep. PAGE, 制备 PAGE; Ag.& comp., 聚丙烯酰胺凝胶琼脂糖凝胶组合中之电聚焦; PAG-IE, 在聚丙烯酰胺中之电聚焦; NEPHGE, 不均质 pH 梯度电泳; FB, 亲和电泳; +, 一般有用; ++, 尤为有用; a, 采用特殊的糖类检出法; b, 在

表 2-2 不同长度 DNA 片段的印渍效率

片段长度 (核苷酸数)	电 印 渍 90 min 后		
	印渍纸上(%)	凝胶中残留(%)	小计(%)
1342	17	79	96
1078	21	76	97
872	31	70	101
606	50	44	94
210, 278, 271	62	14	78
234	69	15	84
194	72	15	87
118	59	31	90
72	56	2	58

表 2-3 细胞色素 bc_1 复合物各亚单位电印渍于两张叠放着 NC 纸上的印渍效率

亚 单 位	印 渍 效 率 (%)	
	第一张 NC 纸	第二张 NC 纸
44000 Mr	65	—
40000 Mr	70	10
30000 Mr(Cyt b+c)	65	12
25000 Mr(FeS 蛋白质)	23	9
17000, 14000, 11000 Mr	21	22

又用混合有抗-Ig G、抗-铁传递蛋白(简称 Tf)和抗-Go 球蛋白(简称 Go)的兔抗血清混合物,对上述 10 张印渍纸分别进行处理,然后再用过氧化物酶联羊抗兔 Ig G 与之反应,最后在二氨基联苯胺和 H_2O_2 底液中显色。由这种特异性免疫检出得到的 10 张印渍谱中的 3 张示于图 2-3。仍然证明使用梯度凝胶可使分子量超过 17 万的 Ig G 和分子量仅 7 万左右的 Go 球蛋白同时迁出凝胶,但是 Go 在印渍 50 分钟后(即第 5 张印渍纸后)逐渐消



图 2-2 用 4~17% 梯度凝胶作模板所得印渍谱

A, 印渍前的凝胶染色谱; B, 第 5 张 NC 纸染色谱;

C, 第 10 张 NC 纸染色谱。

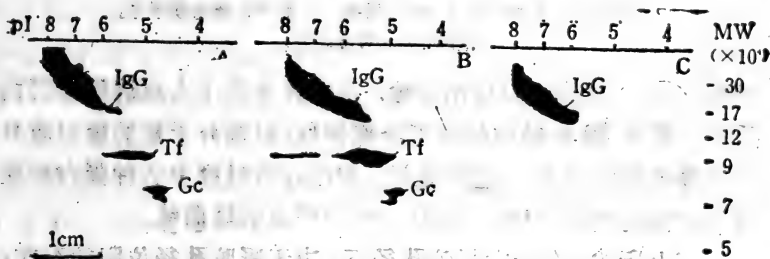


图 2-3 人血清凝胶分离物经特异性免疫检出所得印渍谱

A, 第 1 张印渍纸; B, 第 5 张印渍纸, C, 第 10 张印渍纸。

符号说明见正文。

失了, 而 IgG 在印渍 100 分钟处还有大量被印渍。为了获得印渍时间和印渍效率之间的关系, Manabe 等人^[12] 又用他们自制的电视-微机系统^[13] 对所得 10 张考贝印渍纸上的斑点进行定量分析, 结果得图 2-4 所示曲线。分子较小的 Gc 在第 6 张印渍纸上降为零。Tf 的分子量约 9 万, 它在第 5 张印渍纸上出现高峰, 而在第 10 张印渍纸上消失。分子量最大的 IgG 在第 6 张印渍纸上出现高峰, 但在第 10 张印渍纸上其强度几和第 1 张印

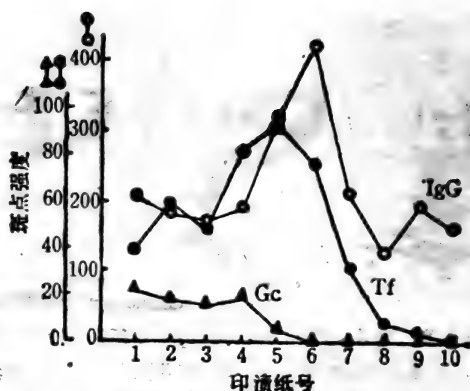


图 2-4 对图 2-3 各印渍谱定量测定的结果
印渍纸号系每印渍 10 min 后换一张新 NC 纸的顺序号。
图中符号说明见正文。

渍纸相同。由此可以得出结论,在这种条件下人血清所含蛋白质大多数在 50 分钟时间内可全部转移,但低分子量的蛋白质具有较高的转移速率。也就是说,在电印渍过程中各种蛋白质在各种时间的转移速度并不相同,各呈明显的峰曲线。

综上所述,在一定凝胶孔径下,由于凝胶孔径位阻的存在,高分子量的生物大分子通常难以迁出凝胶被印渍,虽说在某些尚不清楚的原因下,少数高分子量生物分子也能有效转移。根据这一结论,人们提出了下述种种解决方案: (1)使用可逆的凝胶交联剂代替甲叉双丙烯酰胺,以便在印渍前先将凝胶裂解^[14,15]; (2)印渍前凝胶内的蛋白质先用蛋白酶消化使之水解为较小片段再印渍^[16]; (3)对上万碱基组成的 DNA 片段可引入切口(nick)来改善印渍,例如用紫外光照射凝胶中已被溴乙锭染色的 DNA 来引入切口^[10],或者用 DNase 有限处理导入单链切口于双链 DNA 片段中再电泳,此后的印渍效率可达 93%^[10]; (4)对 RNA 印渍而言,可用稀碱溶液与之短时间保温使之分子

减小^[17]; (5)在印渍缓冲液中加入去污剂(如 0.1% SDS)也能有效地提高高分子量蛋白质的印渍效率^[18]; (6)采用聚丙烯酰胺与琼脂糖组成的组合凝胶,且认为琼脂糖的加入不会影响电泳分辨率; (7)采用线性浓度梯度凝胶^[12]等。有关这类处理的具体操作将在第四章讨论。

2. 上样量与印渍效率

常规凝胶电泳实践表明:“上样量越大,凝胶电泳分辨的区带数目越多,区带强度也随之增加”。生物大分子印渍术是以电泳后之凝胶为模板,是否也符合这一原则呢? Howe 和 Hershey 在用印渍术测定大肠杆菌(*E. coli* MRE 600 株)溶胞物中蛋白质合成起始因子 (Protein synthesis initiation factor) 时,试验了电印渍时间及电泳上样量对印渍效率之影响^[19]。关于前者,我们将在下节讨论。关于后者, Howe 和 Hershey 实验了不同上样量的大肠杆菌粗溶胞物和提纯了的起始因子 2a (IF 2a)。电泳采用著名的 Laemmli 的 SDS-PAGE 系统,丙烯酰胺浓度为 10%,板型凝胶尺寸为 10×14 cm。印渍用电作动力,电压 20 V,电流 300 mA,印渍 6 小时。为了防止电印渍时物质穿透固定化纸,也象 Vaessen 那样^[11],叠放两张 NC 纸。结果如图 2-5 的 B-E 所示,其中 B 和 C 图示电泳时加 *E. coli* 溶胞物 10、40 和 100 μg 蛋白质量的氨基黑染色印渍谱, B 图系叠放着的两张 NC 纸中紧贴凝胶的第一张固定化纸, C 图为第二张 NC 纸印渍谱。可见,上样 10 μg 时所有蛋白区带虽都被固定在第一张 NC 纸上,但因上样太低,虽然直接看印渍纸尚能分辨,经拍照后照片上就看不见了。上样 40 μg 时,第一张 NC 纸上区带清晰,但某些较小蛋白质 (10000~20000 Mr) 则穿透第一张 NC 纸被固定在第二张 NC 纸上(照片也难看出)。上样 100 μg 时大大超过了第一张 NC 纸之容量,各区带大都能在第二张 NC

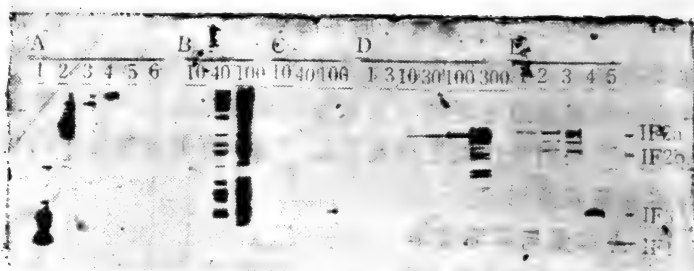


图 2-5 不同印渍时间(A)和不同电泳上样量(B-E)
对印渍效率之影响(说明见正文)

纸上显现(照片上也难分辨)。图 2-5 中的 D 是提纯了的 IF 2a, 经 ^{125}I -抗 IF 2a 特异性免疫检出的放射自显影谱, D 图顶部所列数字系电泳时加 IF 2a 的 ng 量。图 2-5 中的 E 是由各种处理组成的印渍谱, 顶部数字 1~3 列是分别加 *E. coli* 溶胞物 5、10 和 20 μg 蛋白质量进行电泳, 经印渍后再用 ^{125}I -抗 IF 2a 免疫检出的放射自显影谱。4 和 5 列系上 *E. Coli* 溶胞物 40 μg 蛋白量进行电泳, 然后印渍并分别用稀释度为 1:100 的抗-起始因子 3(IF 3) 和稀释度为 1:25 的抗-起始因子 1(IF 1) 反应, 最后用 ^{125}I -A 蛋白显现放射自显影谱(图 2-5 右侧所列 IF 2a, IF 2b, IF 3 和 IF 1 是起始因子标准品的电泳迁移率)。这些实验表明, 随着电泳上样量的增加, 区带被印渍的强度和数目也随之增加。但是, 正如 D 图中上样量达 300 ng IF 2a 时显现的印渍谱那样, 它出现了众多的区带, 似乎 ^{125}I -抗 IF 2a 与之特异性结合能力丧失了。这种现象的原因虽不清楚, 然而说明印渍时必须控制上样量: 过少难以检出, 过多不但超过固定化纸的结合容量从而穿透固定化纸造成损失, 还会产生矫作物。据此, Howe 和 Hershey^[19] 提出了各起始因子在 1~300 ng 范围内呈线性关系的定量依据, 这是用伽玛计数器或扫描斑点面积求

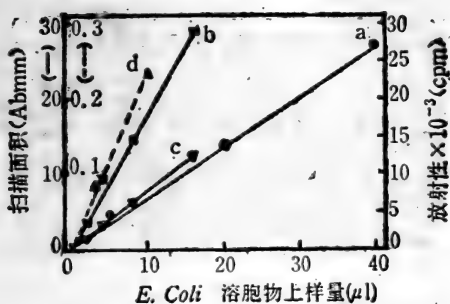


图 2-6 用免疫印渍术定量分析 *E. coli* 溶胞物中各起始因子的结果
a, IF1; b, IF2a; c, IF2b; d, IF3

得的。由此标准曲线求得的 *E. coli* 溶胞物, 各上样量在一定范围内也呈线性关系(图 2-6)。

Vaessen 等人^[11]也证明, 若要用印渍术定量必须控制电泳上样量在一定范围内。他们用酵母溶胞物作为电泳样品, 分别以 1~25 μg 蛋白质质量上样于 11% 的聚丙烯酰胺板凝胶, 然后进行 SDS-PAGE。电泳结束后电印渍于 NC 纸, 电压为 60 V, 印渍 2 小时。印渍后用针对细胞色素 bc_1 复合物的 40000 Mr 亚单位的抗血清保温, 其后再用 ^{125}I -A 蛋白与其反应, 所得放射自显影印渍谱示于图 2-7 A。为了定量, 这种放射自显影谱或用密度计于 550 nm 波长下扫描(图 2-7B 虚线曲线), 或剪下斑点再用伽玛计数器测定放射性。实验结果表明, 两种定量方法都得到区带强度随上样量之增大近线性地增加。计算证明, 本法最少可检出 0.1 ng 的抗原, 但若用伽玛计数定量法, 最大检出值不会超过 20 μg 蛋白质浓度的上样量。这一实验再次证明, 用印渍术定量必须控制上样量在一定范围内, 此值因实验对象、印渍时间和凝胶孔径等差异而有变化。

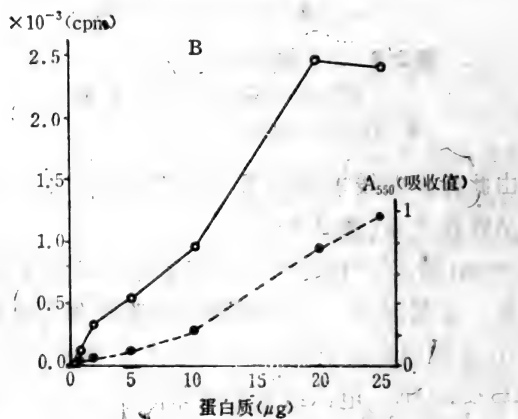


图 2-7 免疫定量检出酵母溶胞液中 Cyt bc₁ 复合物之 40000 Mr 亚单位

A, 不同上样量(μg 蛋白质)的印渍谱; B, 不同上样量的定量曲线。说明见正文。

最近, Ohlsson 等人用市售胰蛋白酶商品, 以 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0 μg 上样量进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 其后用毛细作用印渍法把区带转移于 NC 纸, 并用专一性酶活性染色法显现红色区带。也发现上样量在 0.1~10.0 μg 范围内该酶区带难以显现, 认为印渍术必须考虑所用凝胶模板内区带浓度, 也即必需控制凝胶电泳的上样量^[20]。

3. 印渍时间与印渍效率

前面提及,在一定凝胶孔径下印渍效率与生物大分子的分子量呈反比。那末,延长印渍时间能否使高分子量物质完全转移并印渍于固定化纸呢?对此问题,人们作过一些研究。

Bittner 等人^[10]用 0.75% 琼脂糖凝胶分离经限制性内切酶 *Eco*RI 消化的,经放射性标记的 λ DNA 片段。电泳后把板形凝胶纵切成 2cm 宽的胶条,其中一条经干燥后直接进行放射自显影作为对照,其余胶条经碱处理使 DNA 分解为单链后,在 25mM 磷酸钠缓冲液(pH 6.5)中电印渍于 DBM 纸。此时电印渍时间分别取 30、60 和 90 分钟,印渍电流为 2A,电压为 27V。印渍后各凝胶和印渍纸分别进行放射自显影,并对各区带进行放射性计数。结果如表 2-4 所示,其中印渍效率按下式计算 DNA 的百分数来表示:

$$\text{DNA}(\%) = \frac{\text{DBM 纸上区带放射性} - \text{背景放射性}}{\text{干凝胶中区带放射性} - \text{背景放射性}} \times 100$$

表 2-4 不同电印渍时间对限制酶切 DNA 片段转移于 DBM 纸的印渍效率的影响

片 段 (kb)	印渍 120 min 后还残 留在凝胶中的 DNA %	印渍不同时间后结合于 DBM 纸上的 DNA %		
		30 min	60 min	120 min
21.2	22	51	65	61
7.3	19	38	63	58
5.7, 5.4	15	46	61	62
4.6	28	43	63	58
3.3	25	29	48	49

由表 2-4 可知: (1) 中等大小的 DNA 片段在电印渍 60 分钟时印渍效率最高; (2) 过长的印渍时间(见 120 分钟项), 印渍效率反而有所下降, 这可能是由于物质穿透 DBM 纸的缘故; (3) 本实

验的印渍效率并不遵守与分子量成反比的关系,相反二者呈正比关系(试与表 2-2 比较),这并不奇怪,因为这里采用了大孔的 0.75% 琼脂糖凝胶。

Howe 和 Herskey 也做过印渍时间和印渍效率之间的关系^[19]。他们的实验表明(见图 2-5 A),小分子量蛋白质(如 IF 1, IF 3)的电印渍速率要比大分子的蛋白质(如 IF 2a, IF 2b)快得多,仅需印渍 1 小时就能使印渍效率达最高水平,而后者需 4 小时。另外,他们对印渍 6 小时后的凝胶模板用高灵敏度的银染料检查,已没有任何残留的蛋白质区带存在,但 6 小时的印渍效率并不比 4 小时高,也认为是物质穿透印渍纸的原因。

最近 Svoboda 等人研究了上样量、印渍时间、分子大小和印渍效率之间的相互关系^[21]。此时,他们采用 $80 \times 80 \times 0.7 \text{ mm}$ 的微型板胶进行不连续凝胶电泳。浓缩胶的浓度为 5%,分离胶为 12.5%。电泳样品为 Pharmacia 生产的低分子量标准蛋白质系列。电泳后用他们独创的电印渍装置(详见第三章)印渍于 NC 纸,每 15 分钟换一张新的 NC 纸,直到 90 分钟。由于样品已用 ^{125}I 标记,故用密度计扫描放射自显影谱来定量。结果如图 2-8 所示,其中 A 图表明,较小分子量的 14 kDa 和 20 kDa 在印渍 15 分钟后即达最大印渍效率(>90%);中等分子量的 30 kDa 和 45 kDa 在 30 分钟时达最大;高分子量的 67 kDa 和 94 kDa 需 60 分钟才能接近最大值。此结果充分表明,在一定凝胶孔径下,分子量越大越需延长印渍时间,但过长又将因物质穿透印渍纸而使印渍效率下降。据此,应该根据所需检出物质的分子量来确定合适的印渍时间。图 2-8 中的 B 是不同量的牛血清白蛋白(BSA)经电泳后电印渍于 NC 纸所得时间进程。此结果表明,不同上样量的 BSA 其时间进程相同,均在 45 分钟处达最大值。综合上两项实验结果不难得出下述结论:不同分子量的

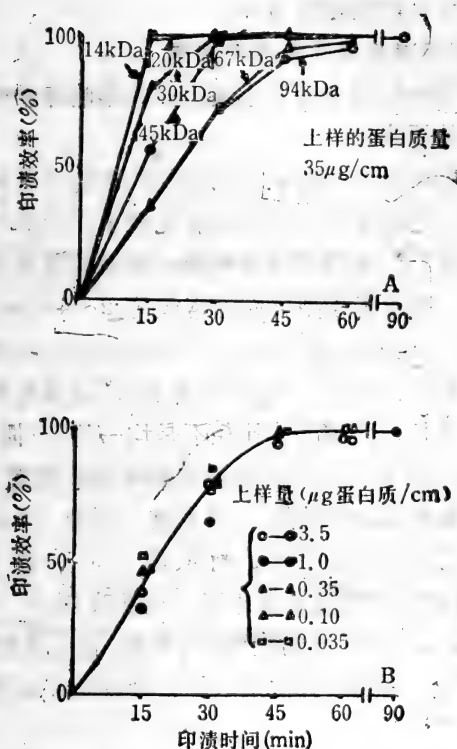


图 2-8 上样量、分子大小、印渍时间和印渍效率的关系

A. 蛋白质分子量标准系列经不同印渍时间的印渍效率。图中 kDa 表示千道尔顿。94 kDa 为磷酸化酶 b; 67 kDa 为牛血清清蛋白; 45 kDa 为卵清蛋白; 30 kDa 为磷酸酐酶; 20 kDa 为大豆胰蛋白酶抑制剂; 14 kDa 为 α -乳清蛋白。

B. 不同上样量的牛血清清蛋白在不同印渍时间的印渍效率。

生物大分子,在一定凝胶孔径下具有不同的时间进程,但同种分子虽上样量不同,其时间进程也相同。值得提出的是,图 2-8 所得印渍效率几近 100%,这显然和 Svoboda 等人所设计的电印渍装置有关,值得重视。关于这种装置作者将在后面集中介绍,

并将讨论该设计的先进性所在。

4. 其它与凝胶电泳有关的因素

从现有有关报道中还能小结出一些影响印渍效率的、与凝胶电泳有关的因素。

(1) 凝胶厚度 一般认为同孔径的圆管型凝胶比板型凝胶更难印渍^[22], 也就是说在一定凝胶孔径下, 印渍时间取决于凝胶模板之厚度^[6]。这是不难理解的, 因为圆管型凝胶直径通常为 5~7 mm, 而常规板型凝胶通常仅厚 2~4 mm。印渍过程中, 不论是单方向印渍还是双方向印渍, 凝胶中的物质必须从一侧迁到另一侧(决不能只从胶中心算起), 迁移路程越长所需印渍时间自然延长。何况凝胶孔径不是均一的(习惯上采用平均孔径), 孔道也总是弯弯曲曲。这些都将加大位阻, 使物质较难扩散迁出凝胶转移于印渍纸。根据这一原理, 印渍术中常把圆管型凝胶纵切成若干长薄片, 再取其中心片条用作印渍模板^[23]。即使采用板型凝胶来印渍, 也常改用厚 1 mm 的薄胶板^[12], 甚至用 0.7 mm 薄的凝胶^[21]。当然, 也有采用 1.5~3 mm 厚的常规板胶, 但此时又常采取加大凝胶孔径或增大印渍电流等措施来补偿^[24]。

(2) 板型凝胶的边缘效应 如所周知, 在板型凝胶上加样有两种基本方式: 一种是采用样品槽模板来制胶, 使凝胶顶部形成一个个相互隔开的加样凹槽。另一种是直接加样于板胶顶部, 使样品成连续的横条, 此时上样量大, 有利于其后的检出或用于小规模制备目的。但是后一种方法因电泳时存在着边缘效应, 区带呈中央下凹的弧线(见图 2-9)^[10]。当用这类板胶纵切为几等分作为印渍模板, 并用于某种比较实验目的时, 两侧胶片和中心胶片无论在区带迁移率或区带强度方面, 都会产生一定误差。事实上这是凝胶电泳引起的, 和印渍处理无关。Stott

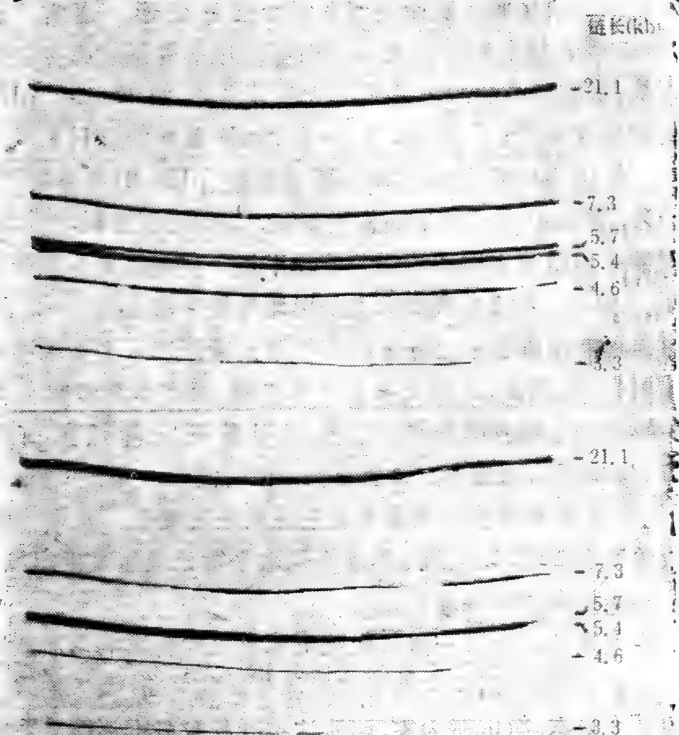


图 2-9 经用 Eco RI 消化并用 ^{32}P 标记的 λDNA 片段，
在琼脂糖凝胶电泳后转移于 DBM 纸所得印渍谱

0.75% 琼脂糖板型凝胶尺寸为 $13 \times 15 \times 0.3 \text{ cm}$ 。采用条状加样方式。

等人^[8]对此曾有详细的定量论证(见图 2-1)，认为印渍中必须排除边缘效应产生的误差。

(3) 凝胶的皱缩与膨胀:

Gershoni 和 Palade 指出^[6]，由于凝胶电泳所用缓冲液和印渍时所用印渍缓冲液的盐浓度不同，因此在电泳和印渍之间需要增加平衡步骤。否则，印渍过程中因盐浓度的改变会使凝

胶发生皱缩或膨胀,从而使印渍区带扭曲变形。通常,正如 Bittner 等人指出的^[10],电印渍时要求电洗脱系统具有较低的电阻抗,因此印渍缓冲液常采用低离子强度,如 25 mM, pH 6.5 的磷酸缓冲液^[10]; 7.5 mM Tris-1.2 mM 硼酸盐 (pH 8.9) 缓冲液^[25],或 15.6 mM Tris-120 mM 甘氨酸 (pH 8.3) 缓冲液^[26]。这样一来,凝胶会在印渍期间发生膨胀,使印渍区带畸变。为此,凝胶常在印渍前先用印渍缓冲液预平衡,使凝胶充分膨胀后再印渍。但是,平衡处理实际上是用印渍缓冲液浸泡 1~2 小时,此时又可能使凝胶中已分离区带扩散出凝胶进入平衡缓冲液而造成损失^[27]。据此,人们又省去平衡步骤,而在印渍时加入 20% 的甲醇来防止凝胶膨胀^[28,29]。然而甲醇既会降低蛋白质从 SDS-PAG 迁出的速率,又会延长印渍时间^[6]。最近 Szewczyk 和 Kozloff 证明凝胶的皱缩常发生在低浓度凝胶,若丙烯酰胺凝胶浓度在 12% 以上时,尽管不采取平衡处理而直接印渍,凝胶也不会在印渍中皱缩^[30]。

除上述外,尚有一些与凝胶电泳有关的会影响印渍效率的其它因素。例如,用等电点聚焦电泳分离的区带,因各物质已处于等电点状态,净电荷为零,印渍这类凝胶时显然不能采用电印渍法,而需改用毛细作用印渍法或接触扩散印渍法。有时,虽没有采用电聚焦的凝胶作模板,在电印渍过程中也会出现某些中等或小分子量的蛋白质,任你如何加长印渍时间也不会使之迁出凝胶。这是由于印渍体系的条件恰好等于该蛋白质达等电点状态的缘故^[31]。此时应该改变印渍体系,或者改变印渍方式。

三、与固定化技术有关的印渍原理

将生物分子、细胞器或细胞,通过适当的物理或化学方法处

理,使它们束缚在特定的支持物上,成为较稳定的、不溶于水、又能保持一定生物活性,这种方法称为固定化技术^[1,2]。被固定的酶称为固定化酶;被固定的细胞称为固定化细胞。生物材料被适当的固定化以后,虽说已被修饰成为衍生物,但常能保持一定的生物活性。例如,一类固定化细胞当供给它们生长培养基时还能用来生产代谢物,从而被称为生长着的固定化细胞 (Growing immobilized cells),或称为固定化活细胞 (Immobilized live cells)^[32]。生物大分子印渍术的重要步骤之一,就是把凝胶电泳已分离的大分子区带转移并固定于固定化载体上,使之形成稳定的、水不溶的、经得起各种处理的、浓集于固定化载体表面从而能容易和各自特异性配体亲和结合的固定化生物分子^[5,6]。显然,有关固定化技术的种种原理也必然成为印渍术的重要依据。但限于篇幅,本节将只讨论固定化技术应用于印渍术中出现的特殊性。

1. 印渍术中所用固定化材料的作用机理

就目前印渍术中所用固定化材料而言,主要有三种: 酸基纤维素纸(如 NC 纸和乙酸纤维素纸)、化学活化纸(如 DBM 纸)和尼龙衬底的膜(如商品名 Zetabind 的固定化膜,简称 ZB 膜)。其中,尤以 NC 纸应用最为广泛。有关印渍术所用各种固定化材料的结构、制造、选择和应用等将在后面专节讨论,这里只涉及主要固定化材料和生物分子的作用机理。

(1) 硝酸纤维素(NC)纸 关于 NC 纸和生物分子的作用机理,目前尚未完全清楚^[6,7]。Gooderham 认为, NC 纸所以能使生物分子固定化是由许多作用的综合结果,包括疏水作用、离子作用以及氢键之形成^[33]。Wallis 等人的实验表明,在 pH 8.0 的印渍缓冲液中,蛋白质较容易被吸附于 NC 纸上,认为在此条件下 NC 纸带有负电故以静电引力吸附蛋白质^[34]。Farrah 等

人则指出^[35], 脊髓灰质炎病毒在中性或碱性下和 NC 纸的结合主要是疏水作用, 因为这种结合不能用减极盐类 (Chaotropic salts) 逆转。Schneider 实验证明^[36], 非离子型去污剂 Triton X-100 能促进蛋白质从 NC 纸上洗脱下来, 故认为蛋白质和 NC 纸的结合主要是疏水作用。Flanagan 和 Yost 则认为, 蛋白质在 NC 纸上的固定化是多点结合^[37], 因此如 Tween 20 一类的去污剂因能取消这些多点结合中的一或数个结合位点而增加固定化蛋白质的可塑性, 从而增加了蛋白质的印盖能力, 使原来未能检出的 6100 Mr 的钙调蛋白的结合蛋白活性显现出来^[37]。Parekh 等人最近详细比较了各种洗脱液组成对洗脱 NC 纸上固定化蛋白质的能力^[38]。此时, 他们把购自 Pharmacia 的标准蛋白质分子量系列(和图 2-8A 所用相同)用 ¹²⁵I 标记, 然后进行 SDS-10% PAGE 并印渍于 NC 纸上。经放射自显影对各区带定位后把印渍纸纵切成 17 等分, 每等分再仔细地切下各区带, 然后用图 2-10 说明中的各系统分别洗脱。洗脱液于 10000 g 下离心 5 分钟, 再分别取上清和 NC 纸用伽玛光谱计测放射性。图 2-10 表明, 各种蛋白质区带均可被内含 50% 吡啶或 40% 乙醇的 0.1 M 乙酸铵缓冲液(pH 8.9)有效地洗脱(曲线 7 和 8)。又表明, 离子型或非离子型去污剂, 以及减极盐类虽能用于蛋白质增溶, 但若把它们单独用于洗脱 NC 纸上的固定化蛋白质常是无效的(曲线 1~4), 即使把它们组合起来洗脱也只部分有效(曲线 6)。这些结果使他们得出结论说: “NC 纸和蛋白质的初级结合是疏水性质的”, 因为用非极性的有机溶剂处理有着最高的洗脱效率^[38]。

需要指出的是, DNA 印渍中双链 DNA 不能结合 NC 纸。为此电泳后需用碱处理凝胶使之解为单链 DNA, 只有这样才能和 NC 纸结合^[29]。单链 DNA 和 NC 纸的作用机理还很少报

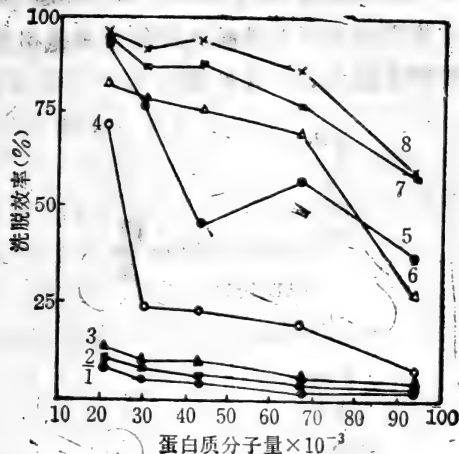


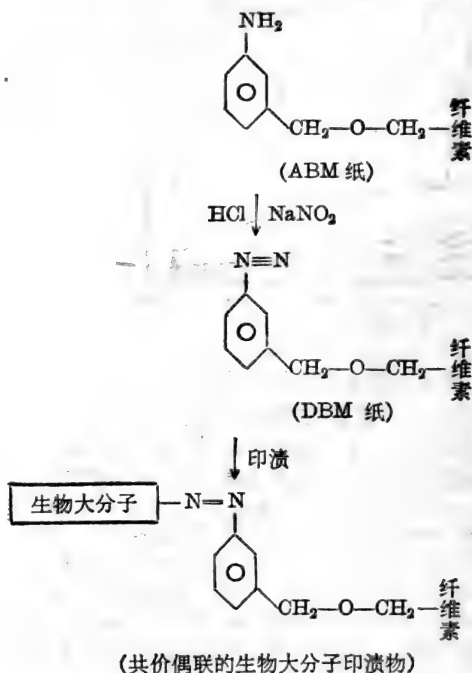
图 2-10 各种洗脱系统洗脱印渍纸上标准蛋白质分子量系列的效率比较

1, 0.1 M 乙酸铵缓冲液, pH 8.9, 100°C 保温 5 min; 2, 内含 1% Triton X-100 或脱氧胆酸钠的 0.1 M 乙酸铵缓冲液, pH 8.9, 100°C 保温 5 min; 3, 内含 6 M 脲或 3 M 盐酸胍的 0.1 M 乙酸铵缓冲液, pH 8.9, 100°C 保温 5 min; 4, 内含 1% SDS 的 0.1 M 乙酸铵缓冲液, pH 8.9, 100°C 保温 5 min; 5, 50% 甲酸溶液, 60°C 或 100°C 下 3 h; 6, 内含 0.1% SDS, 0.5% 脱氧胆酸钠, 和 0.5% Triton X-100 的 0.1 M 乙酸铵缓冲液, pH 8.9, 100°C 下保温 5 min; 7, 内含 40% 乙腈的 0.1 M 乙酸铵缓冲液, pH 8.9, 60°C 保温 3 h; 8, 内含 50% 吡啶的 0.1 M 乙酸铵缓冲液, pH 8.9, 60°C 保温 3 h。实验重复三次, 各次洗脱效率的变化均少于 6%。

道。Nathew 指出这种结合会因温度升高而减弱; 因盐浓度增加而加强^[39]。因此 DNA 印渍时常采用很高盐浓度的印渍缓冲液, 如 50 mM Tris-HCl 或 pH 8.3 2 mM EDTA-50 mM 硼酸盐缓冲液^[40]。

(2) 重氮化纸 关于重氮化纸和生物大分子的作用机理是最清楚不过的。例如重氮化纸之一的市售商品称为氨基苯氧甲

基纤维素纸 (Aminobenzyl oxymethyl cellulose paper, 简称 ABM 纸), 是在临用时才用亚硝酸处理使成重氮衍生物, 然后再用于印渍, 使其和生物大分子共价偶联^[5]:



在此反应中, ABM 纸经重氮化生成的衍生物称为重氮苄氧甲基纤维素纸 (Diazobenzyl oxymethyl cellulose paper), 简称 DBM 纸。在印渍术文献中总是称呼 DBM 纸, 而不提及市售商品 ABM 纸。

Alwine 等人指出^[41], 单链核酸和 DBM 纸的共价偶联是通过核酸中鸟苷或脱氧鸟苷残基的 2 位和尿苷的 5 位来实现的。若用胸苷残基和 DBM 纸反应则要慢得多。用人工合成的多聚

胞苷或多聚脱氧胞苷，以及多聚腺苷或多聚脱氧腺苷都不能和 DBM 纸反应。最近又证明多核肌苷也能和 DBM 纸反应，且也可能是通过肌苷残基的 2 位与之偶联的。Alwine 等人认为，带负电的 RNA 可能首先通过离子作用与 DBM 纸上带阳电的重氮基团连接、接着再发生缓慢的共价键合，最终纸上的阳电荷可以通过水解而逐渐消失^[41]。因此其后只有少量的阳电荷会和探针发生非特异性结合。这一特性使 DBM 纸在印渍并检出时具有高灵敏度和低背景。至于双链 DNA，是不能直接和 DBM 纸偶联的，也必须在电泳后用碱处理使之解为单链才能用 DBM 纸印渍。

蛋白质和 DBM 纸相互作用也有类似情况，即带负电的蛋白质先和带阳电的重氮基团发生静电吸引，然后完成不可逆的共价键合^[15]。现在有证据表明，蛋白质中和 DBM 纸发生共价键合的主要残基是 Tyr, His, Lys, Arg, 也可能还有半胱氨酸残基。Stellwag 和 Dahlberg 指出，甘氨酸也会和 DBM 纸发生重氮反应，因此使用 DBM 纸时应该避免使用 Tris-甘氨酸作为印渍缓冲液^[42]。

由于 DBM 纸是和生物大分子共价连接的，因此容许被固定的分子经受住严厉条件下的种种处理。也容许印渍纸反复使用，让多种探针先后检出多种区带^[41]。但是 DBM 纸内部比较粗糙，印渍中常会降低凝胶中原有区带之分辨率。使用时要加工，没有 NO 纸那么方便。

(3) 尼龙衬底膜(ZB 膜) 这是一类用称为尼龙 66 的聚己二酰己二胺作为材料，在加工时被导入众多的叔胺基使之修饰。因此不仅有着如 NO 纸那样薄而光滑的表面，其机械强度更大而耐用。这类尼龙衬底膜具有众多的阳离子，因此它和生物大分子的结合，公认为是和多阴离子生物分子发生可逆性静电作

用的结果^[26]。Gershoni 和 Palade 指出, 以 SDS-PAG 为模板印渍蛋白质时, ZB 膜比 NC 纸能得到更好的结果, 认为这种效应也是由于 ZB 膜众多的阳电荷引起印渍系统的外电压差而产生的^[6]。如果用毛细作用或接触扩散作用印渍时, 这种电位差可能起着独立的、内在的电迁移力的作用。

前已提及, 双链 DNA 不能和 NC 纸或 DBM 纸结合。但是 Taylor 指出^[43], 天然态双链 DNA 可不经任何处理就能成功地印渍于尼龙膜, 虽说其结合容量比变性 DNA 减少了 5~10 倍。

Flanagan 和 Yost 证明^[37], 蛋白质和尼龙膜也如 NC 纸那样, 是多点结合的, 因为 Tween 20 也能促使蛋白质从尼龙膜上之洗脱。

尼龙膜具有众多阳离子的特性也带来一些问题, 例如它也能和探针牢固结合从而产生非特异性结合的高背景^[26], 必须用合适的猝灭方法封阻尼龙膜上剩余的结合位点^[6]。又例如尼龙膜的阳电荷既排斥阳离子染料使之无法染色; 又过量的结合阴离子染料, 使染色谱具高背景而难以显现区带。至今还没有合适的用于尼龙膜上全谱检出的染料。

2. 印渍用纸的结合容量与孔径

所谓结合容量(Binding capacity)是指每平方厘米固定化材料中所能结合生物分子的最大限度。例如 NC 纸有 $80 \mu\text{g}$ 蛋白质/ cm^2 的结合容量; 而 ZB 膜具有高达 $480 \mu\text{g}$ 蛋白质/ cm^2 的结合容量^[6]。因此 ZB 膜有着更高的印渍灵敏度。不同制造厂家的同种产品, 其结合容量也不相当。例如 Bedford 生产的商品名为 Milipore NO 的硝酸纤维素纸, 由于其内含有众多的酯, 其结合容量仅为 $15 \mu\text{g}$ 蛋白质/ cm^2 ^[44]。就印渍术而言, 为了获得高的印渍效率, 使用结合容量大的固定化材料将更好些。因为高结合容量的材料可以容纳更多的生物分子, 不会因超载而

使印渍区带穿过固定化纸进入印渍缓冲液中造成损失。当然,选择优良的固定化材料不仅要考虑结合容量,还要考虑诸如电性、孔径等因素。例如, Schaltman 和 Pongs 就曾用低容量的乙酸纤维素纸成功地印渍过蛋白质^[45]。

NC 纸是印渍术中目前应用最为广泛的固定化材料,它原先用于分离细菌等之超滤膜,即对颗粒作机械筛分用。筛分时,因它能使颗粒停留在 NC 纸表面,故也称为“表面滤纸(Surface filter)”。又为了筛分各种大小的颗粒,故 NC 纸有各种孔径规格。现在,NC 纸被用作印渍用纸,因被印渍的大分子是通过和 NC 纸的化学吸附作用而被固定化,故称其为“深度滤纸(Depath filter)”^[6]。其实,二者在性质上并无差异。前已提及,印渍时小分子量的生物分子容易穿透 NC 纸进入溶液造成损失,因此必须选择合适孔径的 NC 纸。就目前而言,大都选用孔径为 $0.45\mu\text{m}$, 孔分布的平均密度为 $450\times 10^6/\text{cm}^2$ 的 NC 纸作为印渍用纸^[6]。对低分子量的生物分子而言,则采用平均孔径为 $0.2\mu\text{m}$ 的 NC 纸^[46,47],甚至采用 $0.15\mu\text{m}$ 孔径的 NC 纸^[48];或者把 NC 纸进行共价交联以消除孔径效应^[26]。除此,有人提出采用纯的 NC 纸比混有乙酸纤维素的 NC 纸(如商品 Milipore NC)能更有效地印渍 DNA^[6]。至于重氮纸和溴化氰活化纸因和生物分子共价键合,常不考虑孔径效应。

3. 去污剂的作用

去污剂对印渍有一定作用是肯定的,但究竟对印渍有利还是不利则尚有争论。大多数学者认为,当生物大分子用 SDS-PAGE 分离时,需在印渍前除去 SDS,这也是印渍前进行平衡处理的目的之一^[10,50,51]。因为,除去 SDS 可使多肽在印渍前复性^[37],或者防止 SDS 和 DBM 纸上的重氮基团发生作用。Towbin 和 Gordon 指出,在 SDS 存在下蛋白质在 pH 8.0 下被

吸附于 NC 纸上的效率很差, 因为 SDS-蛋白质复合物带负电难以和 pH 8.0 下具负电性的 NC 纸结合^[7]。De Blas 和 Cherwinski 用免疫印渍术研究单克隆抗体时发现, SDS 和巯基乙醇的存在会使抗原决定簇的构象发生改变。因此印渍于 NC 纸后因不能恢复原来构象, 而使具这种抗原决定簇的抗原不能和其单克隆抗体相结合^[52]。为此, Bowen 等人建议用 0.5% (v/v) Triton X-100 和 4 M 脲来除去 SDS, 并帮助蛋白质复性^[50]。但是, Kuonen 等人最近证明, 采用内含不变性去污剂 Triton X-100 梯度聚丙烯酰胺凝胶分离牛心亚线粒体内膜的膜蛋白, 并印渍于 NC 纸时, 若印渍液中含有 Triton X-100 就将干扰膜蛋白和 NC 纸的结合^[53]。

以上意见表明, 印渍前除去去污剂是必要的。但是, Johnson 等人的看法并不如此^[54], 他们指出, 除了糖蛋白和脂蛋白外, 大多数蛋白质在 SDS 存在下形成具有均一负电荷的 SDS-蛋白质复合物, 因此对这种全带负电的复合物进行电印渍时将可以实现单方向印渍。相反, 用其它凝胶系统分离的蛋白质则显示出广范围的 pKa 值, 使各蛋白质显出不同的电化学性质。对它们进行电印渍时只能是双方向的。即在凝胶的两侧都放上印渍纸, 且需在凝胶的阴极侧放负性固定化纸(如 NC 纸), 而在凝胶的阳极侧放正性固定化纸(如 ZB 膜)。只有这样才能在电印渍后得到两张互补的, 能反映凝胶全部区带的印渍谱。为此, Johnson 等人建议利用 SDS 使非 SDS-PAGE 系统在印渍中实现单方向印渍^[54]。他们的做法是, 把 ¹²⁵I 标记的多瘤病毒的蛋白质用内含乙酸-脲的 PAGE 分离, 然后把凝胶浸入 100 ml 内含 SDS 的缓冲液(2.3 g SDS, 8 ml 甘油, 0.75 g Tris, 0.5 ml β -巯基乙醇, 90 ml 蒸馏水, 用 HCl 调 pH 6.8)中, 在室温下摇 30 分钟, 然后在 24 mM Tris, 192 mM 甘氨酸, 20% 甲

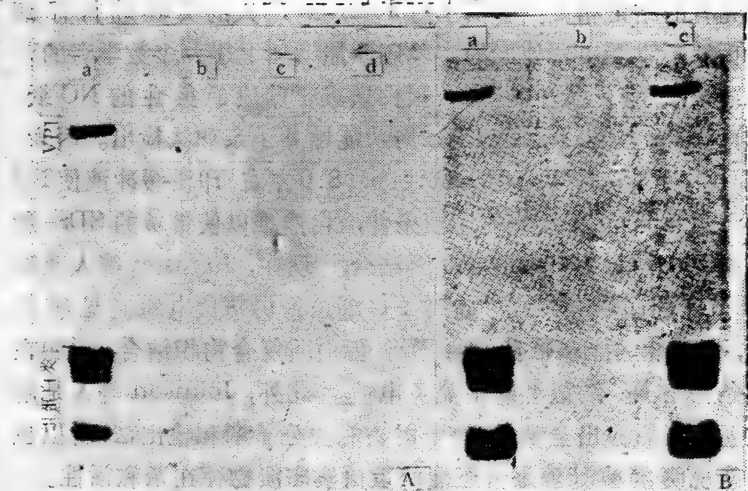
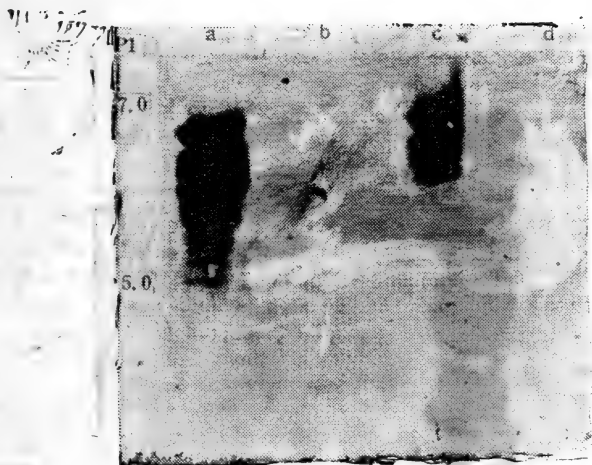


图 2-11 SDS 处理对印渍的影响(说明见正文)

醇(pH 8.3)的印渍缓冲液中电印渍, 所得各放射自显影谱如图 2-11 所示。其中, 图 A 是 ^{125}I 标记多瘤病毒(VP)蛋白质从凝胶转移于 NC 纸的放射自显影谱。a 列是印渍中把 NC 纸放在凝胶的阳极侧; b 列是把 NC 纸放凝胶的阴极侧; c 列和 d 列分别和 a、b 列相同, 但印渍前均未用 SDS 处理。由此可见, 只有印渍前用 SDS 处理, 且把 NC 纸放在凝胶阳极侧者才被印渍。图 B 是凝胶的放射自显影谱, 其中 a 列为 ^{125}I 标记多瘤病毒标准蛋白质在乙酸-脲凝胶中分离所得放射自显影谱; b 列是经 SDS 处理并印渍于 NC 后, 残留凝胶模板的放射自显影谱(其印渍谱即是图 2-11 A 之 a 列)。可见全被印渍了, 并无区带残留于凝胶。c 列是未用 SDS 处理的凝胶(其印渍谱是图 2-11 A 之 c 列), 可见它全然不能被印渍。Johnson 等人的这一实验结果证明了 SDS 能促进蛋白质印渍于 NC 纸, 似乎和上述大多数

研究者的结论相反。事实上对 Johnson 等人的实验进行仔细分析后不难看出，他们的实验还不能动摇上述大多数学者的两项结论：(1)，负性的 SDS-蛋白质难于印渍于负性的 NC 纸；(2)，SDS 使蛋白质失活难以用功能性分子亲和法检出。因为，Wallis 等人认为常用的偏碱性 (pH 8.0 左右) 印渍缓冲液使 NC 纸带负电^[34]。象这样的印渍条件，自然难以使带负的 SDS-蛋白质复合物和带负电的 NC 纸结合。现在，Johnson 等人改用 pH 6.8 的印渍缓冲液，此时 NC 纸是否仍带负电尚无见有报道，但既然它能和带负电的 SDS-蛋白质复合物相结合，说明在此条件下 NC 纸很可能不显负电性。此外，Johnson 等人是用放射自显影检出全谱，没有采用功能性分子亲和检出法，所以也不能说明 SDS 处理是否还能使蛋白质印渍物存在亲和活性。

值得提出的是，Johnson 等人用上述同种方法成功地电印渍了用凝胶等电点聚焦分离的多瘤病毒蛋白质。前已提及，处于等电点状态的蛋白质难以使用电印渍法使之迁出电聚焦凝胶被印渍于 NC 纸。但 Johnson 在电聚焦后把凝胶用 SDS 溶液浸泡，使各处于等电点状态的蛋白质和 SDS 形成带负电的复合物，然后再在 pH 6.8 的条件下使它们电印渍于 NC 纸上。图 2-12 即是 Johnson 等人用 SDS 处理使 ¹²⁵I 标记多瘤病毒蛋白质从等电点 (IEF) 凝胶中电印渍于 NC 纸的放射自显影谱。其中，a 列为印渍时 NC 纸放在 IEF 凝胶的阳极侧；b 列为 NC 纸放在该凝胶之阴极侧；c 和 d 列分别和 a、b 相同，但印渍前未用 SDS 处理。由图可知，用 SDS 处理且把 NC 纸放于凝胶阳极侧时具有高的印渍效率。未用 SDS 处理的 IEF 凝胶也能印渍，但效率低，尤其是处于等电点的酸性蛋白质难以印渍^[54]。在此实验中 Johnson 等人还试验了用 SDS 处理过的 IEF 凝胶是否还具抗原活性。此时他们使用针对多瘤病毒蛋白



从电聚焦凝胶印渍 ^{125}I 标记多瘤病毒蛋白质于 NC 纸的放射自显影谱(说明见正文)

质的抗血清进行免疫印渍, 结果示于图 2-13。这一实验似乎又说明 SDS 处理并没有使印渍纸上的抗原活性丧失, 至少对多瘤病毒的蛋白质是这样。

至于使用化学活化纸印渍蛋白质时, 由于二者系共价键合, 因此去污剂常能在印渍中使用而不必担心它会使蛋白质丧失活性^[7]。Erickson 等人也认为, 印渍缓冲液中加入低浓度的 SDS 能改善蛋白质的印渍^[18]。但是 Lin 和 Kassamatsu 指出^[55], 去污剂 Nonidet P-40 的存在将使蛋白质从 NC 纸上解脱而造成损失。

4. 甲醇的作用

印渍缓冲液中加入甲醇是由 Towbin 等人首先提出的^[44], 其目的在于稳定凝胶模板的几何形状, 使凝胶不会在印渍过程中发生胀或缩。以后不少学者指出甲醇能增加 NC 纸对蛋白质的结合容量^[26, 46, 56]。但是甲醇又会降低蛋白质从 SDS-聚丙烯

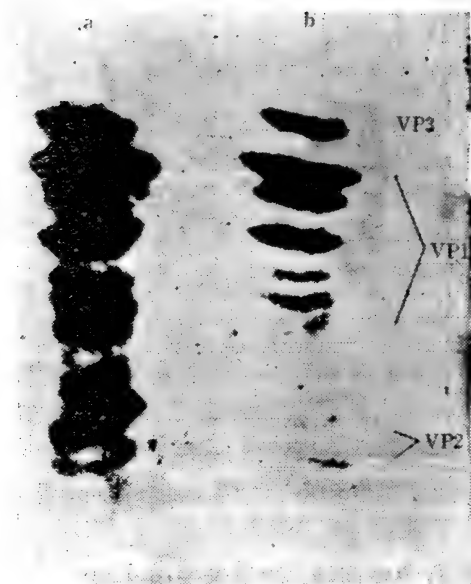


图 2-13 IEF 凝胶经 SDS 处理的免疫印渍谱(b)和直接用放射自显影显现的全谱(a)比较

酰胺凝胶中洗脱的效率^[26]。它的存在需延长电印渍的时间(>12 小时),才能使高分子量蛋白质(>100 万 Mr)有效地印渍^[46]。

最近, Szewczyk 和 Kozloff 详细研究了甲醇在印渍中的作用^[30]。此时,他们采用美国马里兰州 BRL 公司生产的预染低分子量蛋白质标准系列,因为该系列的六种蛋白质组分中有两种是强碱性的,即溶菌酶的等电点为 pH 11.0(pI=11.0)和牛胰蛋白酶抑制剂的 pI=10.5。再者,该系列已经预染,不需再加染料就能在 NC 纸显现斑点,有利于计算印渍效率。除此, Szewczyk 和 Kozloff 总共试验了六种印渍缓冲系统,其中再分为加或不加 20% 甲醇。实验表明(见表 2-5)^[30],印渍术中常用

表 2-5 甲醇对各种蛋白质从 SDS-PAG 转移于 NC 纸的影响

印 渍 缓 冲 液	缓冲液中甲 醇含量(%)	洗 脱 效 率		与 NC 结合程度	
		酸性和中 性蛋白质	强 碱 性 蛋 白 质	酸性和中 性蛋白质	强碱性 蛋白质
1, 25 mM Tris/192 mM 甘氨酸, pH 8.3	20	(a) G	P	G	G
		(b) G	M	G	G
2, 25 mM Tris/192 mM 甘氨酸, pH 8.3	不加	(a) G	M	P	P
		(b) G	M	P	P
3, 0.7% 乙酸	不加	(a) P	P	M	M
		(b) P	P	M	M
4, 25 mM AMPSO, pH 9.5	20	(a) G	M	G	G
		(b) G	G	G	G
5, 25 mM CAPSO, pH 10.0	20	(a) G	M	G	G
		(b) G	G	G	G
6, 25 mM 乙醇胺/甘氨 酸, pH 9.5	20	(a) G	M	G	G
		(b) G	G	G	G

说明: AMPSO, 3-N-(1, 1-二甲基羟乙基)-氨基-2-羟基丙磺酸; CAPSO, 3-N-环己氨基-2-羟基丙磺酸; (a), 凝胶用印渍缓冲液平衡后印渍; (b), 省略平衡步骤; G, 表示好; M, 表示中等; P, 表示差。

的 Tris-甘氨酸缓冲液中加入 20% 甲醇有利于酸性和中性蛋白质从凝胶中洗脱, 并有效地结合于 NC 纸, 但是甲醇并不促进碱性蛋白质的洗脱。经扫描定量表明, 甲醇存在时碱性蛋白质的洗脱效率仅为 10% 左右, 虽说这 10% 全能结合于 NC 纸。省去甲醇, 略能提高碱性蛋白质的洗脱效率, 但又降低了和 NC 纸之结合, 包括酸性和中性的蛋白质也是如此。这一结果表明, 省去甲醇不会导致碱性蛋白质印渍效率的增加, 但甲醇能改善酸性及中性蛋白质和 NC 纸的结合。这是因为甲醇能从 SDS-PAG 中部分地除去 SDS, 从而使 SDS-蛋白质复合物的负性减弱。与此相反, SDS-碱性蛋白质在除去部分 SDS 后仍有强的负电性, 因此难和带负电的 NC 纸结合。Szewczyk 和 Kozloff 据此原理

推断,碱性蛋白质将能在较碱性的印渍缓冲液中转移^[30]。正如表 2-5 所示,使用三种 pH 9.5 左右的印渍缓冲液时都得到了令人满意的结果,而用 0.7% 乙酸缓冲液时无论洗脱效率,还是和 NC 纸的结合程度都很差。

但是,几乎和上述工作同时发表的 Svoboda 等人的论文中^[21],对甲醇的作用提出了又一观点。他们设计了一种能使阴极和阳极溶液分开的属电泳类的电印渍装置。他们发现,若阴极溶液和阳极溶液均由内含 20% 甲醇的 25 mM Tris-192 mM 甘氨酸组成时,从 SDS-12.5% PAGE 分离的,Pharmacia 公司生产的低分子量标准蛋白系列,各组分的印渍效率相差很大,尤其是分子量较大的磷酸化酶 b (94000 Mr) 的印渍效率小于 40% (图 2-14)。实验又证明,若用 0.1% SDS 替代阴极缓冲液中之甲醇,那末各蛋白质印渍于 NC 纸的效率都大为提高,分子量较大的磷酸化酶 b 的印渍效率也将提高到 70%。而且,各种蛋白质穿透 NC 纸的损失也不会大于 10% (见图 2-14 说明及尼龙膜印渍值)。Svoboda 等人为了解释这一机理,他们在凝胶两侧各放七张 NC 纸,经 30 V 下电印渍 1 小时后测各 NC 纸的 pH 值,结果在阳极和凝胶间的七张 NC 纸的 pH 值分别是 2、4、5、5、6、6、7,而放在凝胶和阴极间的七张 NC 纸分别是 8、9、9、10、10、11、12。由此他们认为印渍不仅取决于蛋白质所带电荷、凝胶的分子筛效应,而且也取决于电压梯度。在阳极侧存在 20% 甲醇促进了 SDS-蛋白质复合物的分解和蛋白质和 NC 纸的结合(这和上述 Szewczyk 和 Kozloff 的观点相同^[30]),而在阴极侧存在 0.1% SDS 时可增加阳离子的和(或)疏水性蛋白质的印渍效率,因为 SDS 使它们也带负电,致使体系中只有凝胶的分子筛效应影响转移速率。相反,若阴极缓冲液中存在甲醇,将使 SDS-蛋白质复合物负性减弱,自然难以有效转移了。

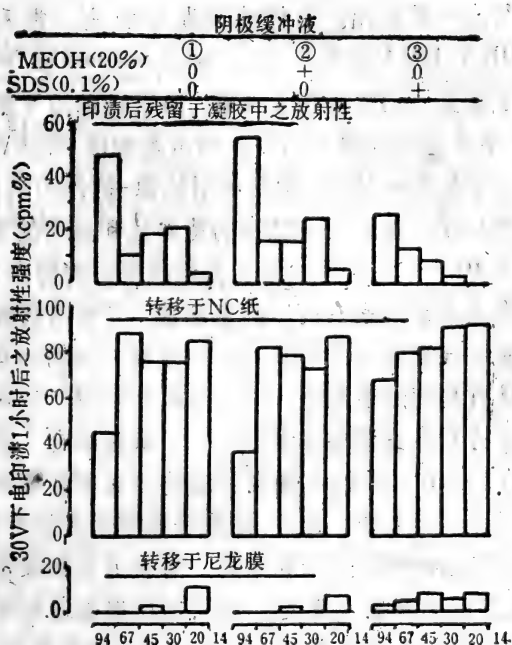


图 2-14 阴极缓冲液中含有甲醇(MEOH)或 SDS 时, 低分子量蛋白质标准系列各组分印渍于 NC 纸、尼龙膜, 以及印渍后凝胶模板中还残留的区带所含放射性低分子量蛋白质标准系列经用 ^{125}I 标记。印渍时, NC 纸和尼龙膜叠放在一起, 以便用尼龙膜计算物质穿透 NC 纸的量。底部数字指出组成低分子量蛋白质标准系列六种成分的 $\text{Mr}(\times 10^{-3})$, 因胰蛋白酶抑制剂(20000)和 α -乳清蛋白(14000)两区带太接近, 难以准确切下, 故一并计数(20/14)。

四、与分子亲和技术有关的印渍原理

印渍术的重要目的在于从众多的被印渍区带中检出少数几种我们感兴趣的区带, 而不是全谱的检出, 为此需要依靠分子亲

和技术进行专一性检出。对核酸印渍术而言,常利用 RNA-DNA 和 DNA-DNA 杂交反应。诚如 Schleif 和 Wensink 所言^[57],分子杂交一词容易使人误解,但它已成为习惯用词。事实上,分子杂交也是利用生物分子的可亲和性,理应归于分子亲和技术。至于免疫印渍术,则是利用抗原-抗体的亲和性,也就是说抗体对其相应抗原具有独特的特异性和高度的亲和力,其解离常数为 $10^{-4} \sim 10^{-10}$ M。结合和运载蛋白的特点之一是与其互补的维生素或激素有高度的亲和性,其解离常数为 $10^{-7} \sim 10^{-16}$ M。膜结合受体蛋白与其互补的激素之间的相互作用也是既特异又具有高度的亲和性,其解离常数为 $10^{-6} \sim 10^{-12}$ M。糖蛋白能和其特异性外源凝集素(Lectin)亲和结合,其解离常数最大,在 $10^{-2} \sim 10^{-5}$ M 之间。酶与其底物或竞争性抑制剂的亲和结合特性更是早为人知。此外,细胞表面有众多的生物分子,因此也能和其亲和物特异性亲和结合,而成为亲和技术中检出病毒受体,细胞亚群等的一亚类。就目前已报道过的有关印渍文献看,上述各种亲和技术都被应用于印渍术中的检出。又由于这种检出是在固定化纸上进行, Towbin 和 Gordon 称之为固相检出技术(Solid-phase detection techniques)^[77]。

1. 分子杂交的一般原理

溶液中双链 DNA 经高温或高 pH 处理即变性为两条互补的单链。逐渐恢复溶液的温度或 pH 值时,根据碱基配对的原则,分开的两条单链会自动复性成原来的双链结构。如果两条单链核酸分子来自不同的物种或品系,只要它们的碱基序列是同源的或部分地同源,那末也能发生全部或部分的复性,这就称作核酸的分子杂交。分子杂交既可发生在 DNA 与 DNA 之间,也可发生在 DNA 与 RNA 之间。在印渍术中,杂交分子之一方已被印渍于固定化纸,另一分子则常常预先用放射性同位素标

记, 并称其为探针。用此探针来识别或“钓出”印渍纸上众多区带中能与它同源的亲和核酸分子, 即是印渍术的重要目的。由于探针具放射性, 因此放射自显影谱上只有杂交分子显现区带, 非杂交分子则不显现, 据此就可识别出所需核酸分子。这类探针的标记方法有许多, 印渍术中常用离体(*in vitro*)标记法。其中又可区分为如下三种方法:

(1) 用反转录法标记互补 DNA(cDNA) 此时以 RNA(如 mRNA)为模板, 通过反转录酶合成 cDNA。假如加入反应系统的 DNA 前体物是放射性的, 则合成的 cDNA 便可用作探针。

(2) 切口移位(Nick-translation)反应 这是目前最普遍采用的标记 DNA 的方法。其原理是, 在大肠杆菌的 DNA 多聚酶 I(DNA polymerase I)参与下, 使反应系统中的四种脱氧核苷三磷酸(其中至少一种是用放射性 ^{32}P 或 ^3H 标记的)掺入待标记的 DNA 分子中。这里的关键是 DNA 多聚酶 I 是个多功能的酶, 与本反应直接有关的是它所具 $5' \rightarrow 3'$ 外切酶功能和 DNA 聚合酶功能。如图 2-15 所示: (a) 加入微量的 DNA 酶 I (DNase I; 或称牛胰 DNA 酶), 使待标记的 DNA 分子链上形成一个切口(nick), 此切口含 $3'\text{-OH}$ 末端和 $5'\text{-P}$ 末端; (b) DNA 多聚酶 I 附着在切口上(它不能附着在无切口的完整双链上); (c) 由于 DNA 多聚酶 I 的 $5' \rightarrow 3'$ 外切酶活性, 它可以从切口开始沿 $5' \rightarrow 3'$ 方向逐个切除脱氧核苷酸, 同时又由于它具有 DNA 聚合酶的功能, 能以切口 $3'\text{-OH}$ 末端为引子, 用对应的一条单链为模板把反应系统中游离的四种脱氧核苷酸逐个地接到切口的 $3'\text{-OH}$ 末端处; (d) 随着上述两个反应不断进行, 图中的切口就不断向右移动, 同时切口左侧的新合成的 DNA 链不断延长。每一个切口可以使其延伸约 400 个核苷酸, 而且每个 DNA 分子的两条链又各可以用 DNase I 造成许多个切口。因

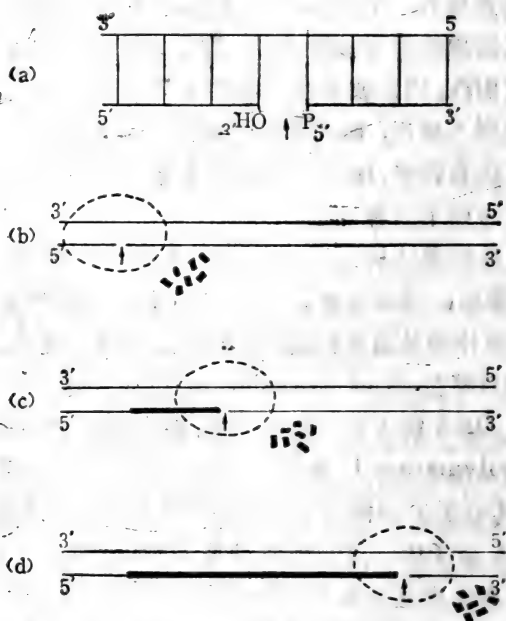


图 2-15 切口移位反应图解

箭头示切口位置；虚线的椭圆形代表 DNA 多聚酶 I；短粗杆线表示四种脱氧核苷三磷酸；粗线表示新合成的 DNA 链。

为加入反应系统的四种脱氧核苷三磷酸中有一或两种是用 ^{32}P 或 ^3H 标记的，所以由此切口移位而新合成的 DNA 链便是放射性的了。又因其碱基序列仍与反应前的 DNA 分子完全一样，所以它可用作杂交探针。

(3) 末端标记法 上述两法均不能标记 RNA 分子，所以当以 RNA 为探针或者当探针 DNA 是只有几十个核苷酸对的小分子时，可用末端标记法。其原理如图 2-16 所示：先用碱性磷酸酶切去待标记核酸片段的 5' 端的磷酸后产生 5'-OH 末端，接着在多核苷酸激酶的催化下把 ATP 中 γ -位的磷酸加到 5'

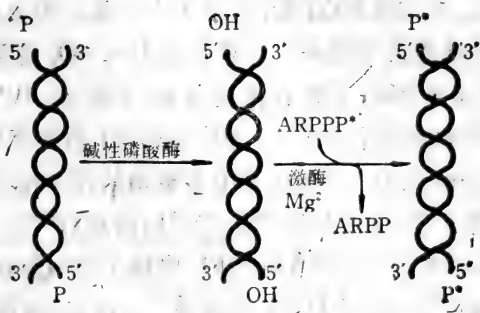


图 2-16 末端标记法图解

P^* 表示放射性的 ^{32}P 。

末端。假如此 5'-位的磷酸根是放射性的,则核酸片段的 5' 末端便被标记上了。

2. 核酸印渍术中有关分子杂交的改良

过去,经电泳分离的限制酶切 DNA 片段需在印渍前先变性使之解为单链,因为双链 DNA 不能和 NO 纸结合。最近 Taylor 提出,具有较大强度和抗毁能力的尼龙膜可结合双链 DNA^[43]。此时,印渍后的尼龙膜可浸于 2.5 M NaCl 和 0.5 M NaOH 混合液中 15 秒使 DNA 变性,再在 pH 5.5 的 3 M 乙酸钠中中和 15 秒后即可用切口移位法制得的 cDNA 探针进行分子杂交。虽说此法的灵敏度较差,但为印渍天然 DNA 开创了先例。

Amasino 最近提出用聚乙二醇(PEG)替代核酸杂交反应液中原加的葡聚糖硫酸酯(Dex SO_4),认为它会增大核酸分子杂交作用的速率^[58]。例如不加多聚物的反应液中,即使含有探针浓度达 1×10^5 cpm/ml,反应仍需经 24 小时才能勉强检出。如果反应液中含 10% Dex SO_4 ,杂交 4 小时后就即可检出结合的 DNA,随着杂交时间延长到 12 小时后可以获得较强信号。但

反应液中若含 10% PEG 时, 少于 4 小时就可检出结合的 DNA, 8~12 小时就能杂交完全, 并获得比 Dex SO_4 更强的信号。又证明, 加 10% PEG 后探针浓度可减少到 $2 \times 10^4 \text{ cpm/ml}$ ^[58], 这比常规核酸杂交中所用 $1 \times 10^6 \text{ cpm/ml}$ 的浓度可少用 2~10 倍。Amasino 认为, 反应体系中多聚物的存在使探针分子被排挤而浓集在一起, 从而加速了杂交反应的进行^[58]。

Radford 在进行 DNA 印渍时, 比较了切口移位法制备探针中用 ^{35}S - 和 ^{32}P - 标记 DNA 的效果^[59]。过去, 常规切口移位法中经常用 ^{32}P 标记, 因为 ^{32}P 可以得到高的比放射性, β -粒子的高能量又可以保证放射自显影较快显现(和用 ^3H 或 ^{14}C 相比较)。但是, 目前已有一种市售高放射性的 ^{35}S - 标记核苷酸商品, 称为脱氧腺苷-5'-[α -硫代- ^{35}S]三磷酸盐 [$(\alpha\text{-}^{35}\text{S})\text{dATP}$]。Radford 的实验证明^[59], 使用 $(\alpha\text{-}^{35}\text{S})\text{dATP}$ 具有另一些优点: (1) 它比 ^{32}P 具有更长的半衰期 (^{35}S 为 87.1 天而 ^{32}P 为 14.2 天), 因此虽贮藏两月仍能获得良好结果; (2) ^{32}P 具有高的比放射性, 在长时间曝光后放射自显影谱上常会形成大面积, 从而掩盖掉邻近较弱的区带。使用 ^{35}S 时, 因其较低的比放射性可使此问题减到最小程度; (3) 可以利用 ^{35}S 和 ^{32}P 放射的 β 粒子能量差, 使用同一张印渍纸进行两种探测而不需抹掉第一探针。此时先用 ^{35}S 标记 DNA 进行探测, 然后再用 ^{32}P 标记 DNA 探测。后者探测时在印渍纸和 X 光底片间加一层塑料纸, 这样只有 ^{32}P 才能透过塑料纸达到底片上^[59]。

3. 免疫亲和结合的一般原理

所有高等动物都有识别异体分子和进入其机体潜伏起来的有害分子的能力, 我们把这套针对侵入物质的主要防御机构称之为免疫系统。凡能刺激免疫系统反应的物质统称为抗原, 而把为了识别抗原由免疫系统产生反应而制造出的蛋白质称为抗

表 2-6 免疫球蛋白的五种基本类型

类 别	重 链	分 子 量	相对于血清浓度(%)
Ig G	γ	150, 000	75
Ig M	μ	900, 000	8
Ig A	α	160, 000	16
Ig D	δ	180, 000	<1
Ig E	ϵ	180, 000	<1

体。事实上, 抗体与抗原的识别是通过一系列的化学键, 虽说这些键的每一个都很弱, 都不是共价键, 但它们加在一起就变得很强。Sikora 和 Smedley 曾形象地描述过抗体和抗原间的亲和结合: “抗体和其抗原的紧密衔接有些象两大块拼板玩具的那种衔接^[60]”。抗体可在血液的球蛋白分部中找到, 故称为免疫球蛋白(Immunoglobulins)。根据它们的分子量可被分为五种基本类型(表 2-6)。所有的免疫球蛋白分子都有类似的基本结构, 都由两条重链和两条轻链所组成, 并由二硫键把它们结合在一

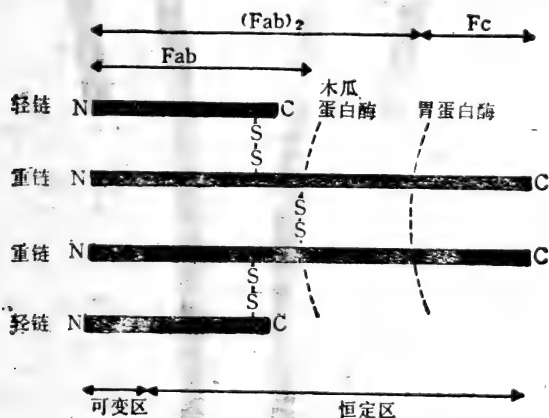


图 2-17 Ig G 的结构

可变区和结合抗原的部位在肽链的 N-末端处。

起。在抗体的重链和轻链中有一些区域称为可变区(图 2-17), 其氨基酸序列因不同抗体而不同, 这种变化都发生在肽链的 *N*-末端处。由此可以想象, 由每一种抗原所出现的每一种可能形状都可为某种抗体所衔接。显然, 较大和较复杂的抗原分子可能有几个不同的区域, 每一区域都能衔接一种抗体, 抗原上的这种区域通称为抗原决定簇 (Antigenic determinant), 图 2-18 示一抗原决定簇结合于一抗体分子 *N*-末端处的情景。前已提



图 2-18 抗原决定簇结合于抗体分子 *N*-末端处的示意图

及,免疫印渍时抗原决定簇的构象会因 SDS 和巯基乙醇的存在而改变,从而导致用其单克隆抗体检出的效率降低^[59]。

在免疫印渍术中免疫检出常采用双抗体间接免疫检出法。这是因为直接用一种抗体来检出抗原时,抗体一方面要用酶,或用荧光染料,或用 ^{125}I 标记的葡萄球菌 A 蛋白(以后简称 A 蛋白)进行标记,另一方面又要保持住和抗原结合的亲和部位,这是很复杂的工作。更由于这类探针的一部分会因化学修饰而影响和抗原的亲合结合,检出时常常需要加大探针用量,也为此常改用间接法。各种标记的间接免疫检出法的原理示于图 2-19。即,固定化的抗原首先和它的免疫球蛋白(常称为 I 抗)结合,然后再用带有各种标记(酶标、荧光标记、 ^{125}I -A 蛋白标记等)的抗免疫球蛋白抗体(常称 II 抗)反应而检出。

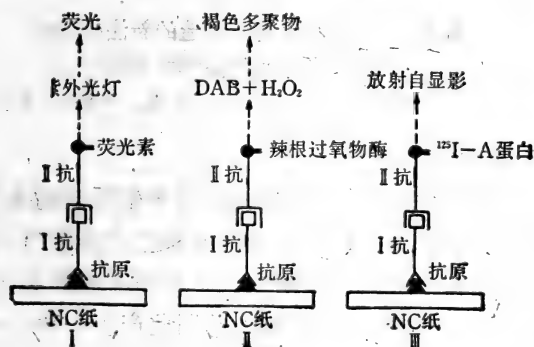


图 2-19 免疫印渍术中常用的三种间接免疫检出原理图

I, 荧光标记; II, 酶标; III, 放射性标记。

最近 Lämmlle 等人在用免疫印渍术检出血液凝固因子 XII(F. XII)中发现, 上述间接免疫检出法在检出 F. XII 中存在三个问题: 首先, 放射标记了的 II 抗会和人 IgG 起交叉

反应；其次，尽管 I 抗已用缺失 F. XII 的血浆吸附过，但还有某些污染抗体存在；再者，放射自显影谱上出现了两条和 F. XII 无关的较弱的区带^[61]。为了克服这些问题，Lämmlé 等人采用了一种新的免疫检出法^[62]，其原理如图 2-20 所示。简言之，固定在印渍纸 (NC 纸) 上的抗原和抗体中的一部分结合后，再和经提纯的已用 ^{125}I 标记了抗原反应而检出。他们的实验表明用此新法灵敏度极高，可检出 0.3 ng 量以下的 F. XII，检出谱清晰无污染区带，也几无背景。



图 2-20 Lämmlé 等人创造的新法(B)和原法(A)不同点的原理示意图

人代表针对 F. XII 的 IgG 抗体；⊗ 表示 ^{125}I 标记分子。

4. 猝灭机理

用一种非特异性的，不和欲检出物发生反应的分子，封阻印渍纸上未结合位点从而消除背景的处理谓之猝灭^[63]。也就是说，不管想试验什么，印渍后印渍纸上不曾印渍着分子的滤纸部分会在印盖时非特异性地吸附探针，并因此产生一种过高的背景。为此必须在印渍后，也即印盖前，先猝灭滤纸上这种剩余部位。猝灭处理通常是把已印渍了的滤纸用高浓度的牛血清白蛋白 (BSA)^[18, 19, 46] 或血红蛋白 (Hb)^[20, 62]，于 25~60°C 下保温 1~12h 来达到。白明胶^[15]、各种动物血清^[63~65]等都曾用作蛋白质印渍的猝灭剂。对 DNA 印渍而言，除使用 2~5% BSA 外，常用 Denhardt 试剂^[66]作为猝灭剂^[63]。

表 2-7 检出 Cl_a M 结合蛋白所用各种猝灭与印盖系统的效率比较

步 骤	NC 印 渍 纸			直接用凝胶印盖	尼 龙 膜
	方 法 I	方 法 II	方 法 III		
猝灭步骤	A 液+0.05% Tween 20, 60 min	(a) A 液, 40 min (b) A 液+30mg/ml BSA, 10 min (c) A 液+1mg/ml poly(Eto), 10 min	(a) 25% n-丙醇 +10% AcOH, 20 min (b) A 液, 20 min (c) A 液+30mg/ml BSA, 20 min	(a) 25% + 10% AcOH, 36 h (b) A 液, 12 h (c) A 液+30mg/ml BSA, 2 h	B 液+1% Hb+0.1% 白明胶, 12 h, 45°C
	A 液+0.05% Tween 20, 75 min	A 液+0.1 mg/ml poly(Eto), 75 min	A 液, 75 min	A 液, 12 h	B 液+1% Hb+0.1% 白明胶, 75 min
	A 液+0.05% Tween 20, 2×30 min	A 液+0.1 mg/ml poly(Eto), 6×30 min	A 液, 6×30 min	A 液, 6×6 h	B 液, 6×30 min
印盖后洗涤步骤	0.14	1.2	8.6	0.74	1.1
	0.62	4.1	37.0	2.20	4.1

A⁺液: 0.05 M Tris-HCl(pH7.6), 0.2 M NaCl, 0.001 M CaCl₂; B 液: 0.02 M Tris-HCl(pH7.4), 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂; poly(Eto), 系 Tween 类化合物, 即多氧乙烯乙二醇, 6×30 min 和 6×6 h 分别表示洗 6 次每次 30 min 或 6 h。

就目前已报道过的印渍术文献看,有两种主要的猝灭方式,一是猝灭剂只存在于猝灭步骤中^[47],它只是为了猝灭印渍纸上非特异性位点。另一种是猝灭剂始终存在于印渍后的各步反应液或洗涤液中^[37],这是因为某些学者认为猝灭剂还能增强其后的印盖效率^[29],或者能促进抗原决定簇构象的复性^[7],如果猝灭剂选择适当的话。例如 Bartles 和 Hubbard 指出,BSA 或 Hb 作为猝灭剂时会抑制 ¹²⁵I-麦胚凝集素结合其糖蛋白受体,如果改用聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinylpyrrolidone; 简称 PP; 平均 Mr=40000)作为猝灭剂,不仅可以猝灭印渍纸上非特异性结合位点,而且提高了糖蛋白的检出灵敏度,这是因为 PP 中绝对不会含有象 BSA 试剂中所含的糖蛋白杂质的缘故^[29]。

值得提出的是, Flanagan 和 Yost 曾系统研究过各种猝灭剂以及上述两种猝灭方式的效率^[37],结果如表 2-7 所示。他们得出结论说,用 Tween 20 作为猝灭剂,除了对猝灭 NC 纸上非特异性结合有用外,还提高了钙调蛋白(CalM)和已印渍于 NC 纸上它的结合蛋白的印盖效率,尤其是表观分子量(Mr)为 61000 的脑蛋白。其最小检出值为 0.62 μ g,这比所试验的其它方法,灵敏度要提高 7~60 倍。除此,表 2-7 也表明,若用凝胶直接印盖需 2 到 3 天,而用方法 I 印盖检出时,包括电印渍步骤在内仅需 16 小时。Flanagan 和 Yost 又提出,不用蛋白质作猝灭剂的又一优点是,所得印渍谱可用氨基黑染色而不会产生高背景。Tween 20 所以能提高印渍效率在于它使多点结合于 NC 纸上的蛋白质消除了部分结合点,这对恢复钙调蛋白的结合蛋白的活性部位将起一定作用^[37]。

参 考 文 献

- [1] 苏拔贤、范培昌等,《生化技术导论》,人民教育出版社,北京,1979。

- [2] 千畑一郎(胡宝华、吴雄江译),《固定化酶》,河北人民出版社,石家庄,1981.
- [3] Lowe, C. R (刘毓秀译),《亲和色谱导论》,科学出版社,北京,1983.
- [4] 刘培楠、吴国利,《基础分子生物学》,高等教育出版社,北京,1983.
- [5] 范培昌,生物化学与生物物理进展,5: 2, 1986.
- [6] Gershoni, J. M. and G. E. Palade, Anal. Biochem., 131: 1, 1983.
- [7] Towbin, H. and J. Gordon, J. Immunol. Methods, 72: 313, 1984.
- [8] Stott, D. T. et al., Anal. Biochem., 149: 454, 1985.
- [9] Andrews, A. T. (ed.), Electrophoresis: Theory, Techniques, and Biochemical and clinical Applications, Clarendon press, Oxford, 1984.
- [10] Bittner, M. et al., Anal. Biochem., 102: 459, 1980.
- [11] Vaessen, R. T. M. J. et al., FEBS Lett., 124: 193, 1981.
- [12] Manabe, T. et al., Anal. Biochem., 143: 39, 1984.
- [13] Manabe, T. and T. Okuyama, J. Chromatogr., 264: 435, 1983.
- [14] Tas, J. et al., Anal. Biochem., 100: 264, 1979.
- [15] Renart, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 3116, 1979.
- [16] Gibson, W., Anal. Biochem., 118: 1, 1981.
- [17] Wahl, G. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 3638, 1976.
- [18] Erickson, P. F. et al., J. Immunol. Methods, 51: 241, 1982.
- [19] Howe, J. G. and J. W. B. Hershey, J. Biol. Chem., 256: 12836, 1981.
- [20] Ohlsson, B. G. et al., Anal. Biochem., 152: 239, 1986.
- [21] Svoboda, M. et al., ibid., 151: 16, 1985.
- [22] Aubertin, A. M. et al., ibid., 131: 127, 1983.
- [23] Southern, E. M., J. Mol. Biol., 98: 503, 1975.
- [24] Hossenlopp, P. et al., Anal. Biochem., 154: 138, 1986.
- [25] McLellan, T. and J. A. M. Ramshaw, Biochem. Genet., 19: 647, 1981.
- [26] Gershoni, J. M. and G. E. Palade, Anal. Biochem., 124: 396, 1982.
- [27] Loeb, M. R., ibid., 143: 196, 1984.
- [28] Bellon, G., ibid., 150: 188, 1985.
- [29] Bartles, J. R. and A. L. Hubbard, ibid., 140: 284, 1984.
- [30] Szweczyk, B. and L. M. Kozloff, ibid., 150: 403, 1985.
- [31] Legochi, R. P. et al., ibid., 111: 385, 1981.
- [32] Cheetham, P. S. J. et al., Biotechnol. Bioeng., 27: 471, 1985.
- [33] Gooderham, K., in Technique in Molecular Biology (Walker, J. M. and W. Gaastra, eds.), pp. 49~61, Croom Helm., London, 1983.
- [34] Wallis, C. et al. Ann. Rev. Microbiol., 33: 413, 1979.

- [35] Farrah, S. R. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 1229, 1981.
- [36] Schneider, Z., Anal. Biochem., 108: 19, 1980.
- [37] Flanagan, S. D. and B. Yost, *ibid.*, 140: 510, 1984.
- [38] Parekh, B. S. et al., *ibid.*, 148: 87, 1985.
- [39] Nathew, C. G. P. in *Technique in Molecular biology* (Walker, J.M. and W. Gaastras, eds.), pp. 273~285, Croom Helm., London, 1983.
- [40] Frossard, P. et al., Anal. Biochem., 134: 265, 1983.
- [41] Alwine, J. C. et al., *Method Enzymol.*, 68: 220, 1979.
- [42] Stellwag, E. J. and A. E. Dahlberg, Nucl. Acids Res. 8: 299, 1980.
- [43] Taylor, G.R., Anal. Biochem., 148: 524, 1985.
- [44] Towbin H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4350, 1979.
- [45] Schaltman, K. and O. Pongs, Hoppe-Seylers Z physiol, chem., 361: 207, 1980.
- [46] Burnette, W. N., Anal. Biochem., 112: 195, 1981.
- [47] Domin, B. A. et al., *ibid.*, 136: 390, 1984.
- [48] Kittler, J. M. et al., *ibid.*, 137: 210, 1984.
- [49] St John, T. P. and R. W. Davis, Cell, 16: 443, 1970.
- [50] Bowen, B. et al., Nucl. Acids Res., 8: 1, 1980.
- [51] Symington, J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 177, 1981.
- [52] De Blas A. L. and H. M. Cherwinski, Anal. Biochem., 133: 214, 1983.
- [53] Kuonen, D. R. et al., *ibid.*, 153: 221, 1986.
- [54] Johnson, T. K. et al., *ibid.*, 133: 126, 1983.
- [55] Lin, W. and H. Kassamatsu, *ibid.*, 128: 302, 1983.
- [56] Nielsen, P. J. et al., J. Biol. Chem., 257: 12316, 1982.
- [57] Schleif, R. F. and P. O Wensink (章静波等译), 《分子生物学实用方法》, P. 159, 人民卫生出版社, 北京, 1985.
- [58] Amasino, R. M., Anal. Biochem., 152: 304, 1986.
- [59] Radford, A. J., *ibid.*, 134: 269, 1983.
- [60] Sikora, K. and H. M. Smedley (范培昌、秦德安译), 《单克隆抗体》, 上海科技文献出版社, 1987.
- [61] Fisher, P. A. et al., J. cell Biol., 92: 674, 1982.
- [62] Lammle, B. et al., Anal. Biochem., 156: 118, 1986.
- [63] Glass, W. F. et al., Anal. Biochem., 115: 219, 1981.
- [64] Lee, C. et al., *ibid.*, 123: 14, 1982.
- [65] White, P. J. et al., J. Immunol. 128: 2751, 1982.
- [66] Denhardt, D., Biochem. Biohys. Res. Commun., 23: 641, 1966.

第三章 印渍装置与操作

生物大分子印渍术所用装置大多由实验室自制。类型虽多,但可按印渍动力归为三类^[1]:毛细作用印渍(Capillary blotting)、扩散印渍(Diffusion Blotting)和电印渍(Electro-blotting)。各类印渍装置在设计上各不相同。目前以电印渍法应用最为广泛,已有几种电印渍槽商品供应,例如我国江苏兴化分析仪器厂生产的转移电泳仪、瑞典 LKB 公司生产的 Transphor Cell^[2]、美国生产的 Trans-Blot Cell(Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.)^[3]和 Hoefer TE42 型转移槽(Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, Calif.)^[4]。其中, Bio-Rad Laboratories 还生产有专供电印渍用的高电流低电压的电印渍槽电源(2.5 A/250V)^[5]。就目前而言,这些电印渍商品还存在各种问题^[6,7],因此新的构思和设计不时有所报道^[8,9]。

需要指出的是,上述电印渍商品以及所有有关电印渍的报道,所用装置实可分为两类:电洗脱装置和电泳装置。前者,两电极和印渍夹层处于同一槽中,同时被同种溶液所浸没^[10]。后者,两电极被印渍夹层分隔开,各被电极溶液所饱和的滤纸所浸润。这些滤纸相当于常规电泳仪中彼此分开的两个电极槽,因此滤纸上被饱和的两电极溶液可以相同,也可以不同。这里所以如此强调两类电印渍装置的差异,是因为采用电洗脱装置进行电印渍时,需采用低电压、高电流电源(约 50V, 5A)^[11]。不注意这一点,误将常规的常压电泳仪的电源(约 500V, 500mA)来替代,其结局将烧毁电流表。

一、毛细作用印渍装置与操作

Southern 开创本技术时即采用这种方式^[12]，他设计的两种毛细作用印渍装置示于图 3-1 和 3-2。经琼脂糖板形或圆管形凝胶电泳分离的 DNA 限制酶切片段，用 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的溴乙锭染色，然后在 254 nm 波长的紫外光下加红色滤光片进行拍照。所得照片可以作为 DNA 片段的全谱检出，以及其后用分子杂交法检出特异性区带时用作定位的对照谱。用一把在火焰

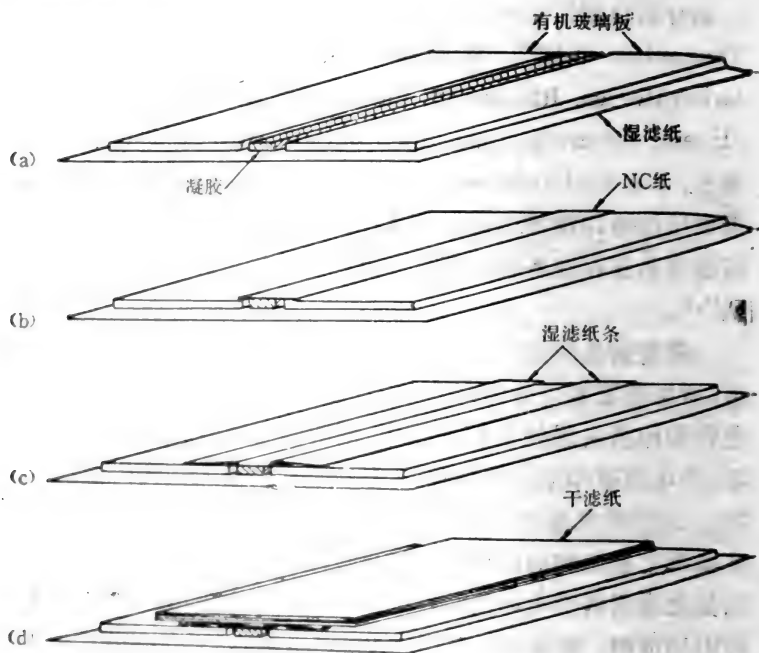


图 3-1 用于板形凝胶条的毛细作用装置
(a)~(d), 示装配的先后步骤。

上烧过的刀片将凝胶纵切成宽 0.5cm 到 1cm 的凝胶条。把各凝胶条分别浸入由 1.5M NaCl 和 0.5M NaOH 组成的溶液中 15 分钟,使 DNA 片段变性解为单链。再把凝胶转入 3M NaCl 和 0.5M Tris-HCl (pH 7.0) 组成的缓冲液中洗涤,以便将碱中和掉。经上述处理过的凝胶条即可作为印渍模板。印渍时,先把一张厚的普通滤纸裁成 20cm × 18cm,在 20 倍由 0.15M NaCl 和 0.015M 柠檬酸钠组成的溶液(简称 20×SSC)中浸湿,然后取出铺于玻璃台板上。如图 3-1a 那样把凝胶条放于湿滤纸上居中位置,其两侧各放一块 5cm × 20cm 的有机玻璃板或普通玻璃板,板和凝胶条相距各 2~3mm,且厚度相同(3mm)。取一张硝酸纤维素纸(即 NC 纸)裁成 2.2cm × 18cm,放入 2×SSC 溶液中浸湿后铺于胶条上,其两侧边缘刚好搭在胶条两侧所放的有机玻璃板上(图 3-1b)。以上操作需注意两点:其一,NC 纸有正反面,正面常称为 NC 表面,较光滑,此面应朝向凝胶;其二,NC 纸和凝胶间,凝胶和湿滤纸之间必需严防气泡。因为气泡会产生高阻抗点,形成低效印渍区。这在印渍术中称为“秃斑(Bald spots)”。同样理由,印渍术中所铺各层间务要紧贴平整。取两张厚的普通滤纸裁成 2cm × 18cm 大小,在 2×SSC 液中浸湿后如图 3-1c 那样分放于 NC 纸两侧的上方。此两张滤纸条的间距刚好等于凝胶条的宽度,即 5mm 左右。最后把 5 张 10cm × 18cm 的干滤纸(普通滤纸、擦手纸等均可)叠放在最上层(图 3-1d),夹层即告装配完成。

对圆管形凝胶柱而言,层间排列与上类似。如图 3-2 所示,凝胶柱直径为 9mm,长 12 或 24cm。据此用有机玻璃粘制成 6 列尺寸与胶柱相当的印渍槽。凝胶柱的处理和板形凝胶相同,但各步时间需延长一些。凝胶放入印渍槽后,把已用 2×SSC 液浸湿的 NC 纸放入胶柱顶部,其上再放 5 张干滤纸即可。

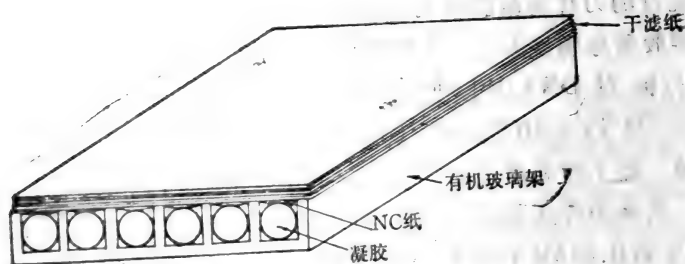


图 3-2 用于圆管状胶柱的毛细作用印渍装置

由上述两种装置不难看出,印渍液(SSO),不论是处于湿滤纸中还是处于凝胶中,系由顶部的干滤纸吸引,通过毛细作用把凝胶中的区带转移于印渍用的固定化纸上而被固定化。至于印渍时间,正如原理一章所述,取决于凝胶孔径,被印渍分子的大小和性质等。在 Southern 从 2% 琼脂糖板形凝胶(厚 3 mm)转移 *E. coli* DNA 的限制酶切片段的实验中约需印渍 3 小时^[12],但他从圆管形凝胶转移小鼠 DNA 的限制酶切片段,即使在印渍 20 小时后仍不能完全转移^[12]。

1979 年, Southern 又把毛细作用印渍装置修改成图 3-3 所示结构^[13],这也是目前许多实验室在用毛细作用印渍法中常用装置。

毛细作用印渍法的最大优点是:不需任何专门装置,操作简便,干扰因素少。缺点是印渍时间较长,分子量大者因孔径位阻和印渍动力较弱而难以迁出凝胶。为此,目前已有一些对此类印渍法进行改良的报道,如 Schaltmann 和 Pongs^[14]在进行果蝇组织培养细胞蛋白质分析中,虽也采用了如图 3-1 的类似装置,但他们把此装置整套放入加有盖的、高为 2~3 cm 的玻璃盒中,以便印渍体系在长时间印渍后还能保持一定湿度。Miskin 和 Soreq 不但把毛细作用装置进一步简化,且把整个夹层干脆

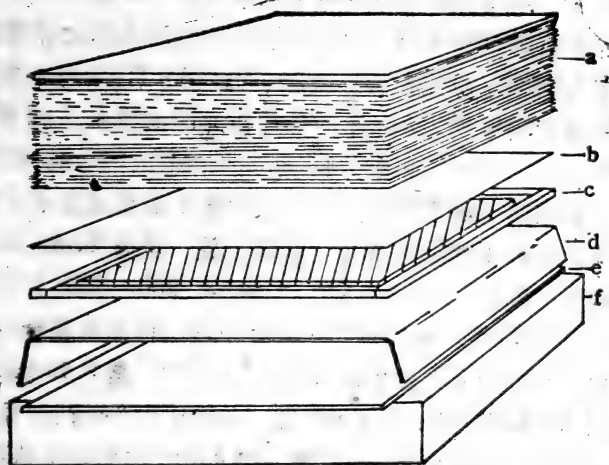


图 3-3 用于琼脂糖板形凝胶的毛细作用印渍装置

- a. 一叠干滤纸; b. NC 纸; c. 由一圈塑料条围住的凝胶;
d. 两侧下弯并浸入溶液的厚滤纸; e. 玻璃板; f. 印渍缓冲液槽。

放入恒湿培养箱中进行印渍^[15]。他们先把 NC 纸用 0.1M Tris-HCl (pH 8.1) 的印渍缓冲液浸泡, 取出沥干水滴后夹于两张普通滤纸间压去过多的水分。平铺于盘中, 再把凝胶放在 NC 纸上面, 连盘放进恒湿箱中, 37°C 下印渍 2 小时即告完成。Ohlsson 等人^[16]以及 van den Berg^[17]则在毛细作用印渍夹层的顶部放上几公斤的重物, 以便保证各层间良好接触。Peferoen 等人则把整个装配件放入大型真空干燥器中, 利用减压真空来缩短印渍时间。现在, 毛细作用印渍法虽应用不多, 但对大孔径的琼脂糖凝胶或琼脂糖-聚丙烯酰胺组合凝胶中区带的印渍, 还时有报道^[16, 17]。因为这类大孔凝胶一般均能在 2~3 小时内完成印渍, 温和的条件又有利于用印渍术分析酶活力^[17]。

最近, Thompson 等人提出了一种很有启迪性的毛细作用

印渍方法，并成功地定量分析了玉米苗龄为3星期的叶子粗提液中谷酰胺酶(EC 3、5、1、2)活力^[10]。他们先把含谷酰胺酶的样品在12%(w/v)淀粉板形凝胶(12×15×1.2cm)中电泳，电泳后的凝胶横切成2mm厚的薄片作为印渍模板。再按图3-4所示把凝胶夹于滤纸和成像胶(Image gel)之间。具体做法是，先在台面上铺一块塑料布，其上放两张干的普通滤纸，由它们吸引其上各种凝胶层的水分。滤纸上放一块厚4mm、内含离子交换树脂(Dowex AG 1—X8，乙酸型，200~400目；或者用Dowex AG 50W—X8，H⁺型，200~400目)的琼脂糖(0.75%)凝胶片。Thompson称此凝胶为成像胶^[10]，是把71mg/ml(指AG 1—X8树脂)或49mg/ml(指AG50W—X8树脂)量的湿树脂混入融化了的琼脂糖，然后灌入厚4mm的框架中铸造，冷却后即成。成像胶上面安放电泳凝胶，其上再放浸透底物溶液(25mM L-谷酰胺、100mM 乙酸钠，pH4.9)的普通滤纸。各层安放完成后，提起下层塑料布的四角，把整个夹层包裹起来以防水分蒸发。由上可知，在夹层最下面的两张干滤纸的吸引下，最上层的滤纸中所含底物将被吸引进入电泳凝胶中，并在其中和含谷酰胺酶的区带发生酶促反应。酶反应产生的产物(谷氨酸)又将被吸引进入成像胶中。由于成像胶中含有细目离子交换树脂，

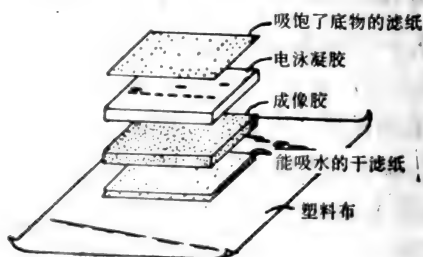


图3-4 测定谷酰胺酶活力的毛细作用印渍夹层装配图

所用条件又只能使谷氨酸吸着,故能不受其它杂质干扰地、有选择性地检出谷氨酸并予以定量。为此, Thompson 等人称此为产物选择性印渍(Product-Selective Blot)^[19]。预备实验证明, 室温下印渍 1 小时反应即能完全。为了使产物全能进入成像胶中, 他们在印渍后, 仔细地除去电泳凝胶和成像胶的上、下层滤纸, 再把这两块胶(切勿移动位置)放在凝胶真空干燥器中。此时成像胶朝向真空源, 在不加热的情况下抽真空 20 分钟, 使酶反应产物全部进入成像胶中。除去电泳凝胶, 再把成像胶用 500ml 水在轻轻摇动下洗涤。共洗 8 次, 每次 15 分钟, 以便去除谷氨酸以外的任何杂质。洗涤后成像胶用 Davies 和 Miflin 所创酚酞试剂使谷氨酸显色。通常在 10~30 分钟内即能得到很好的荧光显色谱, 可在长波长紫外灯下拍照, 然后用密度扫描仪在 465nm 波长下进行定量。

如所周知, 在不变性电泳凝胶中原位检出酶活性有许多困难, 因为很难在凝胶中把底物和酶反应后产生的产物分开。迄今常用的在不变性凝胶电泳后的酶活性定位法, 又只限于少数能生成可着色物质的酶类, 如乳酸脱氢酶的同工酶等。现在 Thompson 等人所创产物选择性印渍法是把产物特异性地结合于成像胶中的固定化材料(树脂)内, 这就解决了酶反应中产物和底物难以分开这一问题。此外, Thompson 的实验开创了印渍生物小分子的先例, 其意义是重大的。

二、扩散印渍装置与操作

扩散印渍又称接触-扩散印渍(Contact-diffusion blotting)^[21]、扩散转移(Diffusion transfer)^[21], 或间接扩散转移(Diffusion-mediated transfer)^[22]等。

扩散印渍装置类型不多,大都按图 3-5 所示夹层装配,然后把整个夹层放入大容量的玻璃缸内即可。图 3-5 实际上是 Bowen 等人用扩散印渍法检出海拉(HeLa)细胞核中结合 DNA 的蛋白质时所创装置^[23]。装配前,泡沫塑料垫和 NO 纸需用印渍缓冲液(他们采用 0.05M NaCl、2mM Na-EDTA、0.1mM DTT、10mM Tris-HCl, pH7.0 溶液)浸湿。因为市售泡沫塑料垫内常混有去污剂,用前需先用大量水清洗除去。又因泡沫塑料多孔,内藏大量气泡,必须把它放在印渍缓冲液中用手(戴手套)按压除气后使用。NO 纸浸泡时要分两步进行,先把 NO 纸漂浮在印渍缓冲液上一段时间,再把它浸没于溶液中。这样做可以防止 NO 纸表面残留气泡。装配时,先把不锈钢筛板放入印渍缸底部,放上一块泡沫塑料垫(用数张已用印渍缓冲液浸湿过的普通滤纸替代也可),其上放一张 NO 纸,再放凝胶。此后再顺次放 NO 纸、泡沫塑料垫和不锈钢筛板。显然,夹层的各层尺寸要相当;层间务必无气泡。装配好夹层后徐徐倒入印渍缓冲液。Bowen 等人的实验采用 2L 印渍液,扩散印渍 36~48 小时,并在 12 小时处更换一次新鲜的印渍缓冲液。

由上可知,扩散印渍是把凝胶夹于两张印渍纸中间,凝胶中的区带借助扩散作用迁出凝胶并被吸附于印渍纸上。其主要优点是可同时获得两张相同的印渍考贝,印渍效率可达 75% 左右。缺点是印渍时间比毛细作用印渍法还要长。由于扩散印渍装置至今无多大改进,这里不再讨论。

三、电印渍装置与操作

电印渍(Electroblotting)^[18]又称电转移(Electrotransfer)^[22]、电洗脱(Electroelution)^[24]、横向电泳(Transversal

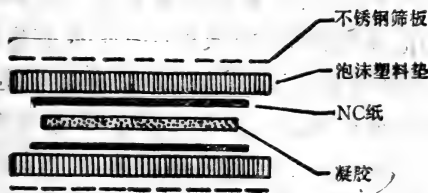


图 3-5 扩散印渍法所用夹层装配图

electrophoresis)^[37]、电转移印渍 (Electrotransfer blot)^[257]、电泳转移 (Electrophoretic transfer)^[267] 等。电印渍首先由 Towbin 提出^[27]，由于此法印渍时间短，印渍条件容易控制，重现性好，印渍效率高等特点，是目前最广泛采用的印渍方式。

电印渍装置各式各样，而且新的设计还在不断涌现^[9]。作者认为，种类虽多，但可按电印渍装置的形状分为水平式(如图 3-8)和直立式(图 1-5)两类。若按原理，又可分为电洗脱类型和电泳类型。前者(图 1-5)，两电极处于同一槽内，同时被浸没于大体积的同种溶液中；后者大多属水平式，两电极分占夹层的上、下两端(如图 3-9)，它虽无常规电泳仪那种分放两电极的电泳槽，但因两电极各处于由相同或不相同溶液浸透的滤纸上或下方，故实际上和电泳装置并无两样。

(1) 直立式电印渍装置 在第一章中绘出的直立式电印渍装置(图 1-5)系由 Stellwag 和 Dahlberg 设计的^[28]。与此类似的装置曾有许多报道，例如 Reiser 和 Wardale 设计的电印渍装置(如图 3-6 所示)。夹层是在槽外装配起来的。此时，先把有机玻璃板平放在桌面上，再放上已用印渍缓冲液 (pH9.2, 50mM 硼酸钠缓冲液)浸透了的泡沫垫(5mm 厚)，其上再放已用印渍缓冲液平衡过的凝胶。铺上一张新制备的重氮苯硫醚纤维素纸(DPT 纸)后，再放一张浸过印渍缓冲液的普通滤纸(如

Whatman No. 50)。最后再放上第二块 5mm 厚、并浸透印渍缓冲液的泡沫塑料垫，以及第二块多孔有机玻璃板。装配时各层间，尤其是凝胶和 DPT 纸之间，务必不能夹有任何气泡。装配结束后用两根橡皮筋圈在夹层之两端，使各层紧贴在一起，这样就可以把整个夹层竖放入印渍槽内。印渍槽是用厚 0.6cm 的有机玻璃粘制而成，内部尺寸为 $19.7 \times 20.4 \times 23.2$ cm。槽两侧粘有两块圆形板，其四周绕有铂丝，成为环形铂丝电极。两电极相距 12.5cm，夹层则放在两电极中心位置处。在 Stellwag 和 Dahlberg 采用这一装置印渍猿猴病毒 40(SV40) 的蛋白质时，电压控制在 400V，约 300~400 mA，即电压梯度为 32V/cm。印渍 1 小时，槽内溶液温度由原来的 10°C 升温到 20°C。印渍效率在 52~60% 之间，分子量越大印渍效率越差。

Bittner 等人设计的电印渍装置也属此类，而且现有电印渍商品大都以此设计为基础。该装置结构示于图 3-7^[10]，系由夹层和缓冲液槽两部分组成。其中电极框较为复杂(图 3-7A)，

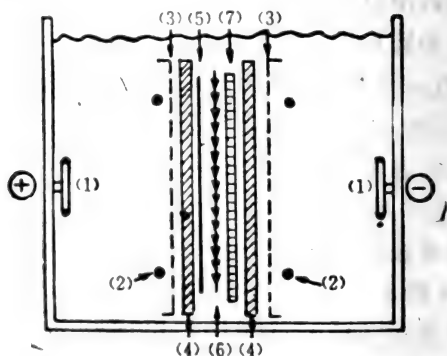


图 3-6 直立式电印渍装置示意图

- (1) 电极；(2) 橡皮圈；(3) 多孔有机玻璃板；(4) 泡沫塑料垫；
(5) 普通滤纸；(6) DPT 纸；(7) 凝胶。

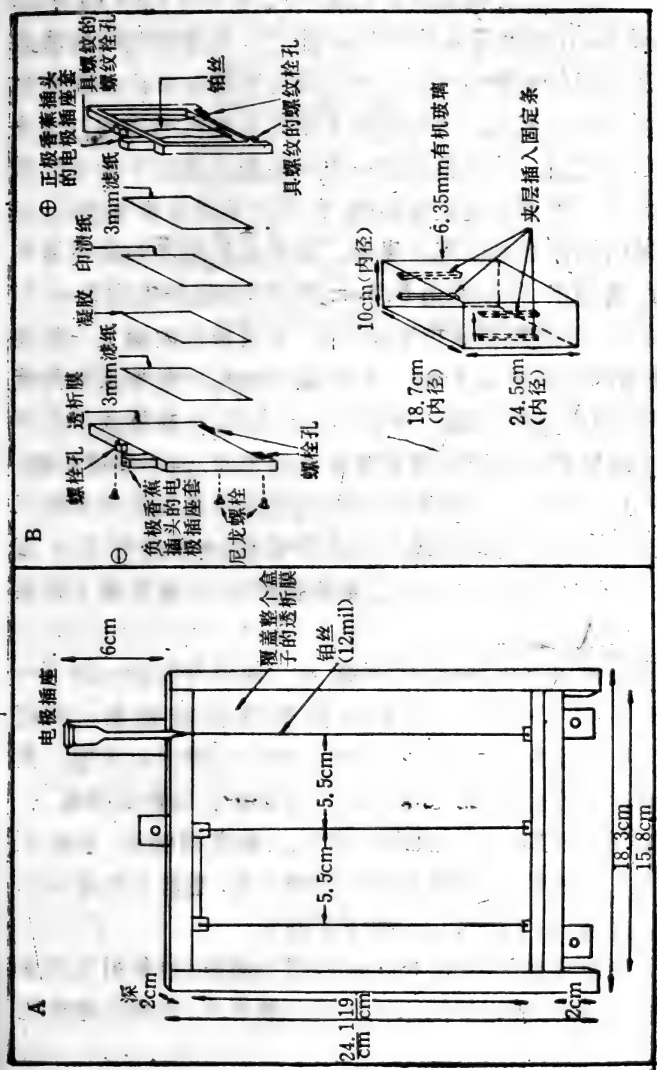


图 3-7 Bittner 等人^[10]设计的电印渍装置

A. 电极框放大正视图, 框内尺寸为 $2 \times 9 \times 15.8\text{cm}$; B. 夹层装配图(上图)和缓冲液槽结构图(下图)。

这是由厚 1.27cm 的有机玻璃粘制成内尺寸为 $2 \times 9 \times 15.8$ cm 的电极框架。Bittner 等人的实验证明^[10], 板形凝胶的印渍最好把它放在平行的金属电极板之间, 因为和缓冲液比较起来金属板电极将有小的阻抗, 任何电压上于这类电极都将均匀地分布于整个电极表面, 从而提供均一电场使板形凝胶中各处区带能均匀地转移。铂电极是较理想的, 它不容易因电解而损耗, 但是即使最薄的铂片都是极其昂贵的, 为此他们用实验证明用铂丝按一定距离排布(如他们用 5.5cm 间距)也能产生均匀分布的电场。此外, 他们为了保护铂丝电极, 在负极框内铺上一张透析膜, 此膜和铂丝相距 1.5cm。铂丝接于伸出电极框顶的香蕉插座上, 以便和外电源接通。为了使夹层夹紧, 电极框顶部和下部附有三个螺旋插孔。正电极框结构与此类似, 但不放透析膜; 三个螺旋孔内有螺纹, 以便尼龙制成的螺栓可通过负极框的三个孔旋入正极框相应孔的螺纹内使夹层紧固。电极框有 2cm 高的脚支撑, 目的是使夹层底部可放电磁搅拌棒, 以便使整个体系温度恒定。

缓冲液槽也由有机玻璃粘制而成, 内尺寸为 $10 \times 19.7 \times 24.5$ cm(图 3-7B)。槽两侧各粘有两根有机玻璃条, 间距 4.5cm, 夹层装配好后可插入其间使之固定在槽中心位置。夹层装配和前述装置差不多, 只是省略了泡沫垫。即按负极框、一张普通滤纸、凝胶、NO 纸(或 DBM 纸)、一张普通滤纸、正极框的顺序排列。印渍时, 用印渍缓冲液浸没夹层, 电流控制在 2A。因有搅拌装置, 印渍 1 小时后升温 5°C 左右。

由图 3-6 和图 3-7 可知, 电流既作用于凝胶, 也作用于其周围溶液。换句话说, 两电极间未被夹层分隔开来, 故均为电洗脱装置。

(2) 水平式电印渍装置 图 3-8 是 Gibson 设计的水平式

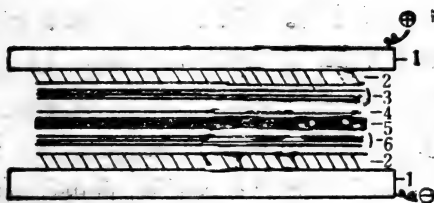


图 3-8 水平式电印渍夹层装配图

1. 石墨板电极；2. 氯丁二烯橡胶垫；3. 三张浸透印渍缓冲液的普通滤纸；4. NC 纸；5. 凝胶；6. 三张浸透内含链霉蛋白酶的电极缓冲液的普通滤纸。

电印渍装置^[29]。他为了提高高分子量蛋白质的印渍效率，在阴极侧的电极缓冲液中加入蛋白酶，使凝胶中高分子量蛋白质先经蛋白酶原位温和水解为较小片段，然后转移并印渍于阳极侧的 NC 纸上。具体做法是，先在绝缘台板上放上一块重 1.7 kg，尺寸为 $30 \times 16 \times 2$ cm 的石墨板作为阴极，其上覆以氯丁二烯橡胶垫。取三张浸透了含有 25 或 $75 \mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉蛋白酶的电极缓冲液 (0.1% SDS、25 mM Tris、192 mM 甘氨酸) 的普通滤纸 (Whatman 3MM)，把它们放在橡胶垫上。被巨细胞病毒 (Cylomegalovirus) 感染的人包皮成纤维细胞，取其细胞核粗提液，经 ^{14}C 标记后于 14% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳。电泳后的凝胶 ($180 \times 180 \times 0.75$ mm) 纵切为 4 作各种试验。其中一块 (4.5×15 cm) 经同种电极缓冲液 (不含蛋白酶) 平衡后放在上述三张滤纸面上。取 NC 纸切成凝胶同样大小，并在印渍缓冲液 (25 mM Tris, 192 mM 甘氨酸, 20% 甲醇) 中浸湿，放在凝胶的上面。三张用同种印渍缓冲液浸湿的普通滤纸叠放在 NC 纸上，最后覆以第二块橡胶垫和石墨电极板。整个夹层的装配要求迅速，避免凝胶脱水，又要快中求稳，以防气泡混入夹层内。在 Gibson 的这一实验中，采用 12V 电池充电器作为电源，起始电

流为1.5A,印渍2小时。结果表明,分子量高达145000的蛋白质在无酶溶液中印渍,印渍效率小于50%,而加酶印渍时印渍效率高达98%。这是因为印渍过程中,阴极侧三张滤纸中的链霉蛋白酶在电驱动下进入凝胶,使蛋白质产生“切口”,而容易迁出凝胶。由上可知,电流只穿过凝胶,两电极虽没有分装两槽,但各以三张滤纸吸满电极溶液,它相当于彼此分开的电泳槽,因此这种电印渍装置实为电泳装置。

Vaessen 等人设计的水平式电印渍装置也有类似结构^[30]。他们把尺寸为150×200×1mm的不锈钢板作为阴极,并平铺于扁平的盘中(图3-9)。阴极上铺一张浸过0.5%SDS的普通滤纸。纸上放凝胶后覆以一张NO纸。其上再放10~15张用印渍缓冲液(192mM甘氨酸,25mM Tris,20%甲醇,pH8.3)浸湿的普通滤纸。另一块和阴极同样大小的不锈钢板放在这叠滤纸上作为阳极。3~5张也浸透印渍缓冲液的普通滤纸放在阳极上,然后压上1.5kg的重物使各层间平整(重物可用瓶内装水替代)。最后在盘内仔细地灌入印渍缓冲液直到刚好淹没阴极时为止。Vaessen 等人用此装置从11%聚丙烯酰胺板形凝胶

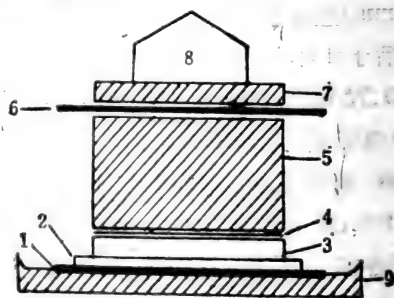


图3-9 水平式电印渍装置示意图

1. 阳极; 2. 一张普通滤纸; 3. 凝胶; 4. NO纸; 5. 10~15张普通滤纸; 6. 阳极; 7. 3~5张普通滤纸; 8. 1.5kg的重物。

中,转移酵母线粒体细胞色素 bc_1 复合物的亚单位于 NC 纸上。印渍在室温下进行。印渍中逐渐增大电压(直到 60V),以保证电流不超过 250mA。印渍共 2 小时。由此装置中两电极被分开的情况看,它也属电泳装置。

(3) 电印渍装置的近代改良 自 1984 年以来,随着生物大分子印渍术的蓬勃发展,人们越来越理解到现有电印渍商品中存在的许多问题,于是纷纷提出新的设计。这里选择其中的三种,它们似能启发出更新的构思,也同时能反映出原有电印渍装置所存在的一些关键性问题。

(i) 多考贝电印渍装置: 1982 年, Manabe 等人开发了一种微型多样品双相凝胶电泳技术^[31]。这是 8 块 $38 \times 38 \times 1\text{mm}$ 板形凝胶并联于同一架微型板电泳槽中进行电泳的新技术^[32,33]。当时, Legooki 和 Verma 已经提出在一块凝胶模板上印渍数份考贝的印渍方法^[34]。Manabe 等人立即意识到这种多考贝印渍术可用于他们多样品微型凝胶电泳的印渍,于是设计出如图 3-10 所示的多考贝电印渍装置^[33]。这是由可开关的活动盖板和印渍缓冲液槽两部分所组成。盖的主板(A)由有机玻璃板制得,尺寸为 $190 \times 80 \times 5\text{mm}$ 。主板下粘有一块有机玻璃制成的凸出物(B),借助它的重力以及能扣住主板的凹槽,使盖板可以灵活地开和关。主盖下面凸出物前方还用两块有机玻璃板桥接着一块 $43 \times 170\text{mm}$ 的有机玻璃板(J),用它作为电极等的支持板。一根粗 0.3mm,长约 720mm 的铂丝,横向弯曲成板块状作为阳极(O)。其下一块硬质泡沫垫(可用防震用包装填料板代替)裁成 $43 \times 170\text{mm}$ 大小(D),用有机玻璃制成的长螺丝(K)把此泡沫垫(D)连同铂丝电极一起固定在支持板(J)上。印渍槽外形如图 3-10 中 H、I、L 等所示,也全由有机玻璃粘制而成。整个装置是倾斜着的,以便印渍时电极发生的气泡能沿斜坡逸出。

于更换新的 NC 纸, 以达到多次印渍得多考贝的目的。正因为这样, NC 纸的一侧可以稍伸出, 并搭在槽前端所附可上下活动的栅格上, 印渍一次后只要向上提栅格就能把 4 张 NC 纸同时翻起, 使之脱离凝胶利于换新的 NC 纸再次印渍。印渍开始时, 因盖子放下后盖下所连凸出物(B)进入印渍缓冲液, 使印渍缓冲液向上提升达到阳极表面而使电路接通。Manabe 等人在其血清蛋白质的印渍中使用恒电流为 150mA (起始电压梯度为 12V/cm), 每印渍 10 分钟换一次 NC 纸。可印渍 5 次, 共得 2^0 张考贝。

(ii) 使用表面导电玻璃作为阳极的电印渍装置: Svoboda 等人提出^[9], 为了保证电印渍快速而又可重现地进行, 垂直于凝胶的电场必须是均匀的; 在不产生过激状态下电压梯度尽可能高。前者决定了区带转移的一致性, 后者决定着电印渍速度。前面所提及的种种装置中, 以采用铂丝编织成相距一定间隔的电极组件(如图 3-7 和 3-10 所示)为最佳。目前国内外电印渍商品大多为这种电极, 且因两极相距较远, 两极间的电压梯度约在 10V/cm 左右。但是所用铂丝很长(每极需 1.5m , 共 3m), 再加上致冷系统, 价格是十分昂贵的。为此有人改用石墨板或不锈钢板(如图 3-8 和图 3-9)。它们价格便宜, 如果两极间距离短一些也能产生均匀电场。但也有一些问题, 例如石墨电极机械抗性差, 易发生电损伤; 不锈钢电极则不能抗阳极氧化。据此, Svoboda 等人设计了以不锈钢板作阴极, 以抗氧化的、在玻璃表面镀有 $20\sim 30\text{nm}$ 厚的金属氧化物(大多数是氧化亚锡)熔凝层的导电玻璃板作阳极。此外, 他们根据两板状电极间距离越短电场越均匀、电压梯度也越大的原理, 把两极间的距离缩短到不大于 1cm 。这样一来, 尽管所上功率不大于 0.1W/cm^2 , 而电压梯度可高达 $30\sim 40\text{V/cm}$, 这就缩短了印渍时间。相反, 如

图 3-6 所示装置, 由于极间距离长, 即使加压到 200V 也刚能达到 10V/cm 的电压梯度。而且体系因此发热而需附加致冷系统。

Svoboda 等人设计的电印渍装置示于图 3-11^[9]。阴极(6)系将厚 1mm 的不锈钢板边缘一侧弯曲, 并在其上焊接导线(7)所构成。该电极平面部分尺寸为 10×15cm。作为阳极的氧化亚锡表面导电玻璃(1)各国均有市售商品, Svoboda 等人则是购自比利时布鲁塞尔的 Glaverbel 公司。购来后为了加接导线可在其四周涂上一周宽 0.5cm 的胶态铜(即印刷线路板的铜印刷), 其上焊导线(4)以接电源。为了屏蔽, 此印刷圈可用一个由

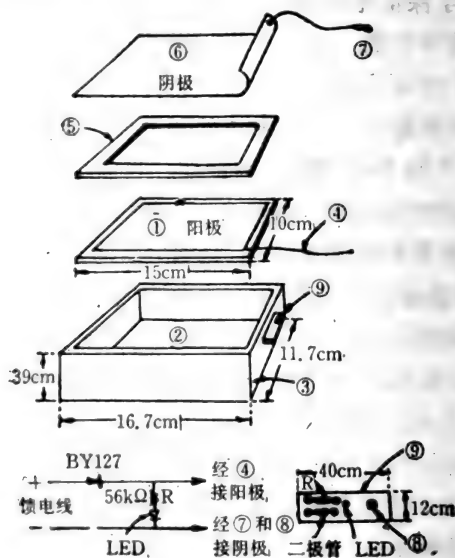


图 3-11 应用表面导电玻璃作为阳极的水平式电印渍装置结构示意图

LED 为发光二极管。图中数字说明见正文。

聚氯乙烯制造的,厚 3mm、宽 1cm 的隔离框(5)封闭。此框可用氟硅酸酮胶粘粘牢于印刷铜圈上。印渍槽用有机玻璃粘制成盒状,大小为 $3.9 \times 16.7 \times 11.7$ cm。由于氧化亚锡表面导电玻璃板电极可抗阳极氧化,但不抗阴极的还原作用,因此电源的正负极不能接错。为防错接引起不必要的损失,他们用一只 BY127 二极管来保护,反接时则电路不通。又为了使电路有良好的接通通路,在正、负极间并联了串有 $5.6\text{k}\Omega$ 电阻的发光二极管(LED)线路。此电器元件焊接在一块板上(9),装于印渍槽一侧。为了方便,电极插座(8)也可安装其上。

印渍夹层的自下向上的排列顺序为阳极板、七张浸透阳极缓冲液(25mM Tris-192mM 甘氨酸, pH8.3, 内含 20% 甲醇)的滤纸、NO 纸(也用阳极缓冲液浸湿)、凝胶、七张以上浸透阴极缓冲液(内含 0.1% SDS、pH8.3, 25 mM Tris-192 mM 甘氨酸)的普通滤纸、阴极。最后在不锈钢阴极板上压上 0.3kg 的重物。恒电压控制在 30V 时起始电流为 0.3 A, 印渍 1 小时就能印渍完全,此时电流减半。

Svoboda 等人指出,他们用此装置每周实验一次,共达两年‘未见电极有何损耗或变质^[9]。印渍时,由于所用功率很小,没有看到电极有气泡发生。

由上装置可见,两电极分放于浸透不相同电极缓冲液的滤纸上,实为电泳装置。

(iii) 两用式电印渍槽: 以上介绍的电印渍装置或为水平式,或为直立式。最近,Stott 等人设计了一种既可用于水平式,也可用于直立式的两用电印渍槽^[36]。如图 3-12 所示,印渍槽呈立方体(26cm^3),系用 5mm 厚的有机玻璃制成。底部两侧各粘一块 $9 \times 26 \times 0.5\text{cm}$ 的长方形有机玻璃板,使槽底中央形成一条深 5mm、宽 8cm 的沟(图 3-12d),以便印渍夹层直立地插

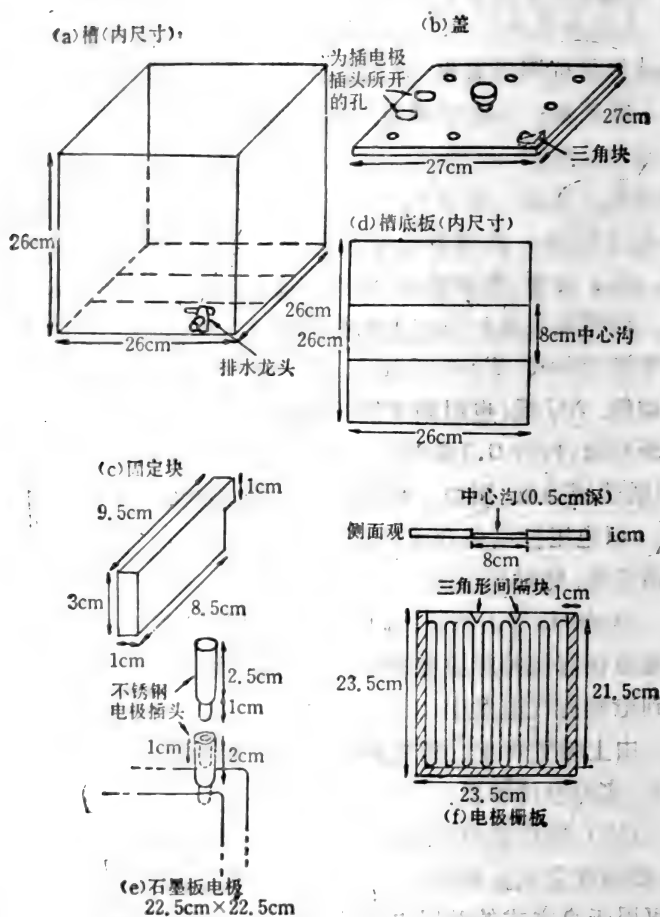


图 3-12 两用式电印渍槽结构示意图

- (a) 槽(数字为内部尺寸); (b) 槽盖; (c) 固定架(共 4 块);
 (d) 槽底; (e) 示石墨板电极电线插座和插头; (f) 电极栅板。

入此沟内。槽盖上粘有柄,四周钻有九孔,用于散热。其中两孔呈条状(图 3-12b),电极接线柱可从此孔伸出。盖的四角粘有三角块,使槽盖放在槽上时不会移动。电极采用了 $22.5 \times 22.5 \times 1.3\text{cm}$ 的石墨板,板缘钻一孔并如图 3-12e 所示插入一个中空的不锈钢圆柱体(长 2cm ,直径 0.9cm),用它作为电源输出线接头。再用有机玻璃按图 3-12f 制成栅格,装配印渍夹层时把它插在石墨电极和泡沫塑料垫之间,以便通电后产生的气泡可以由此放出。为此,栅格的三边粘有 U 形边框,另一边的中部粘两块倒三角块。把此栅格紧贴石墨电极时,电极产生的气泡即可向上逸出。由四块有机玻璃制成如图 3-12o 所示的固定架四块,用作直立式印渍时的固定支架。

印渍夹层的装配如图 3-13a 所示。先把阴极板放入槽底、然后按次放入电极栅格、泡沫塑料垫、一张普通滤纸、凝胶、NO 纸、一张普通滤纸、泡沫塑料垫、阳极栅格和阳极板。槽内放入部分印渍缓冲液(0.025M Tris , 0.072M 甘氨酸、 $\text{pH}8.8$),戴上手套有力地压阳极板,使层间和泡沫塑料垫中空气挤出。若作为水平式印渍,此时只需在阳极板上压一重物,接通电源即可。若作为直立式印渍,只需用手抓住夹层的两边,并滑动其底缘使其嵌入槽底的沟中,上缘用四块固定架(即图 3-12o)使夹层直立于槽中央。加盖后补加印渍缓冲液使充满整个印渍槽,此时即可接通电源开始印渍。Stott 等人在从 SDS-PAG 转移核蛋白于 NO 纸时采用 2A 电流,此时电压梯度在 $4 \sim 5\text{V/cm}$ 左右。印渍 2 小时后结束,液温最多只升到 25°C ,凝胶表面温度也为 25°C 。印渍效率可达 $70 \sim 100\%$ ^[96]。Stott 等人认为石墨板电极价格便宜,又能保证获得均等电场,所设计的印渍槽能维持一种陡的电压梯度,这就保证能在 2 小时内转移完全。他们又认为铂丝电极尽管弯成各种经仔细设计的拓扑形状,但并联的电

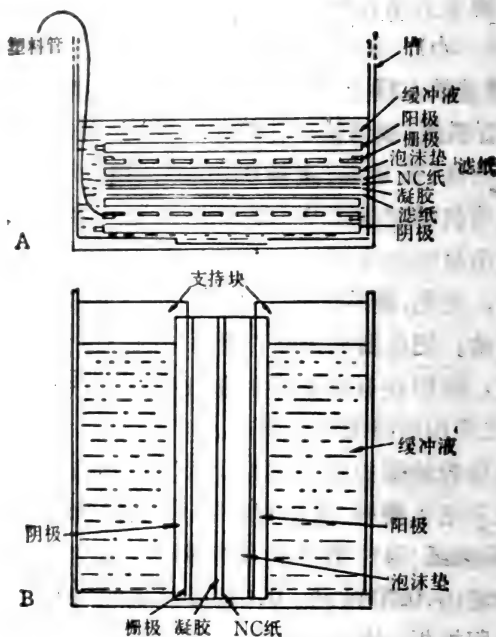


图 3-13 两用式印渍槽所用印渍夹层的
装配(a)和直立式安装示意图(b)

极丝之间任何非绝缘物质的接触都会扰乱电场的均一性。此外，他们也认为夹层外的致冷循环圈不是必须的。

四、其它辅助装置与操作

(1) 分子杂交狭槽 在核酸印渍术中常用分子杂交法检出特异性核酸片段。通常，分子杂交反应是在可加热封口的市售食品塑料袋内进行^[85]。此时，一张 $17 \times 12\text{cm}$ NC 纸需加 15ml 内含放射标记探针的杂交溶液。鉴于放射标记探针得之不易，

加之杂交反应要求较高浓度($10^3 \sim 10^4$ cpm/ml), 因此设法减少探针用量又不降低检出灵敏度是核酸印渍术中人们关心的问题。Southern 开创印渍术时设计了一种专用于分子杂交的狭槽^[12], 其外形如图 3-14 所示。它很容易用有机玻璃粘制。其内尺寸为: 高 2cm, 宽 8mm, 长则比所用印渍纸条(Southern 的印渍纸条为 1×18 cm^[12]) 稍长 1cm。装置的顶板上开一狭槽, 以便插入印渍纸。采用这种装置, 对 1×18 cm 的印渍纸而言只需 1ml 杂交溶液。

(2) 多槽检出盘 免疫印渍术中重要的应用之一是筛选大量样品中抗体-抗原复合物^[36]。近代在单克隆抗体生产中, 也要求能快速地从众多的杂种瘤克隆中筛选出某种特异性抗体^[37]。此外, 同种抗原制剂印渍后常需用各种病人的血清去探测, 以了解何种病人的血清识别了何种抗原。有时人们在这类实验中还要比较各种稀释度抗体检出同种抗原制剂的灵敏度, 这样将需同时处理更大批的印渍纸。Victor 等人为此设计了一种多槽检出盘(图 3-15)^[38]。它是用有机玻璃粘制而成, 共有 25 条狭槽, 每狭槽的尺寸为 $10 \times 22 \times 228$ mm。应用时, 先把印渍了抗原的 NC 纸纵切成 $0.5 \sim 0.8$ cm 宽、如图 3-16 所示的狭条, 并分放于多槽检出盘的狭槽中, 分别加入不同稀释度的抗体溶液(病人血清或单克隆抗体) 10 ml, 然后把检出盘放于旋转式摇床上摇动 1 小时使之反应。其后洗涤、酶联第二抗体等反应均在此检出盘中进行。这种检出盘的狭槽数, 尺寸大小可按不同实验目的进行修改。



图 3-14 分子杂交专用狭槽

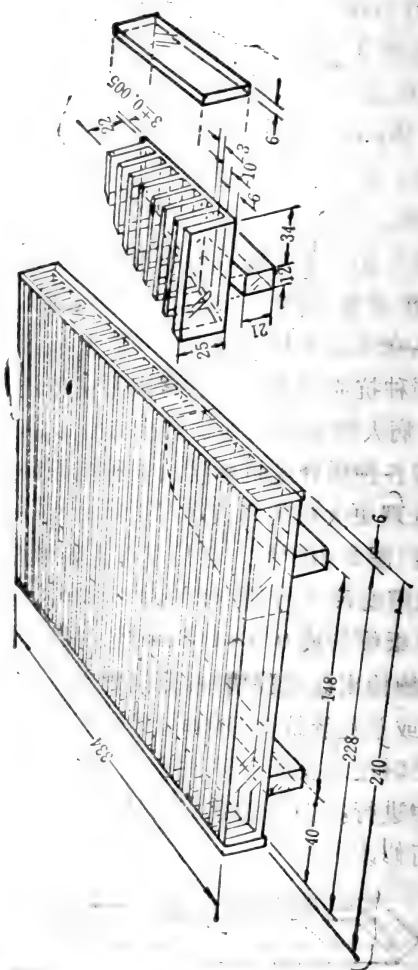


图 3-15 免疫印渍术中加工众多印渍条时所用多槽检出盘
左图, 装置全貌; 右图, 装置一角之剖析, (图中数字单位为毫米)。

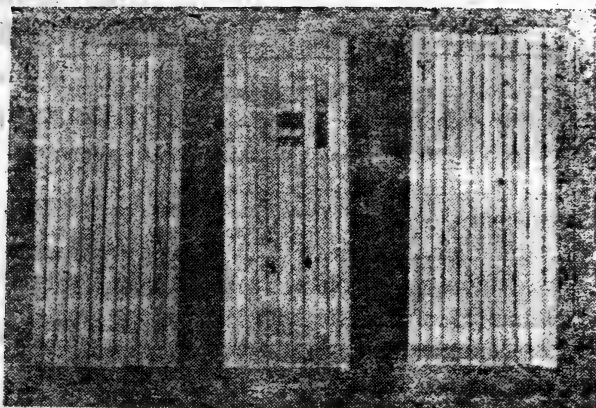


图3-16 印渍有抗原的NC印渍纸纵切成条的情景

(3) 常规印渍与点印渍两用检出装置 在第一章中曾经提及一种直接把抗原点在NC纸上,然后采用常规印渍术处理NC纸使之免疫检出的方法——点印渍法(Dot blotting)。由于常规印渍术常需预先摸索欲检测生物大分子的最佳试验条件,例如确定抗原或I抗、II抗的浓度、选择合适的猝灭条件和染色时间等。为了处理大批样品,人们常采用点印渍术作为先行步骤^[39]。除此,一些不要求电泳分辨的大量样品的抗原或抗体筛选,也往往采用点印渍术^[40]。点印渍时,通常用微量吸管直接把抗原样品按 $5\sim 220\mu\text{l}$ 量点于固定化纸上(见图1-2c)。通常,一张 $9\times 9\text{cm}$ 见方的固定化纸大致可以点上 $4\sim 5$ 行,每行8个样品点。即点之间的距离约 0.5cm ,斑点直径 $0.6\sim 1.0\text{cm}$,行距约 1.5cm ,因此共可点样 $32\sim 40$ 个^[17]。最近 Alric 等人为了使点印渍能容纳更多的样品,能使上样更省时省力,同时又能用于常规印渍,设计了一种可以常规印渍和点印渍两用的检出装置^[17]。如图3-17所示,全装置由I~IV共四部分组成。图中,

I 为盖子，两侧装有螺丝孔，能使各组件在装配后紧固成一体。

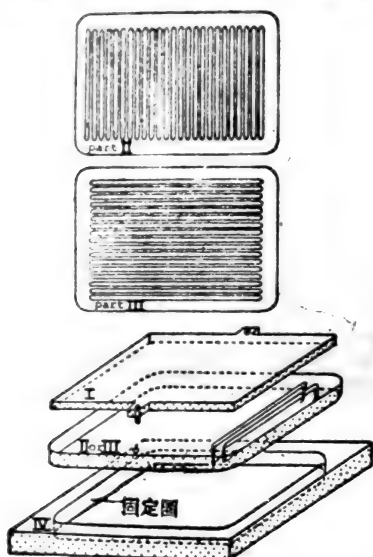


图 3-17 常规印渍和点印
渍两用检出装置

I. 盖； II. 具垂直坑的板；
III. 具水平坑的板； IV. 底盘。

II 是具垂直坑的板，坑深 10 mm，宽 2 或 3 mm，长 80 mm。III 是具有水平坑的板，坑的尺寸为 10×2 (或 3) $\times 120$ mm。IV 为底盘，内粘有 I~III 部分的插入圈。当用于常规印渍检出时采用该装置 I、II、IV 部分组装。此时，提纯了的线粒体内膜经板形 SDS-PAGE 分离，并电印渍于 NO 纸 (9×13 cm)。NO 纸经猝灭后铺于装置的底盘 (IV) 中，其上放三张经同种缓冲液浸湿的普通滤纸。把具有垂直坑的板 (II) 插入底盘的

插圈中，两侧用钢夹使之与底盘紧贴在一起。各坑自左向右用 a~w 予以编号，在坑中分别加入不同种或量的免疫血清，坑 i~w 中分别加或不加各种稀释度的单克隆抗体。静置 10 分钟后，取走钢夹，加上盖板 (I)，用两侧螺旋拧紧于底盘上， 20°C 下保温 2 小时。反应完毕后除去 I 和 II，用刀片从 j 坑处切开 NO 纸，把 a~i 部分的 NO 纸经洗涤后和 ^{125}I -A 蛋白保温，其它 NO 纸则在 ^{125}I -羊抗小鼠免疫球蛋白中保温。所得放射自显影谱如图 3-18 所示。使用免疫血清的坑显示了大量的区带，使用单克隆抗体的坑只显一或数条带，不同纯度会有一些差异。

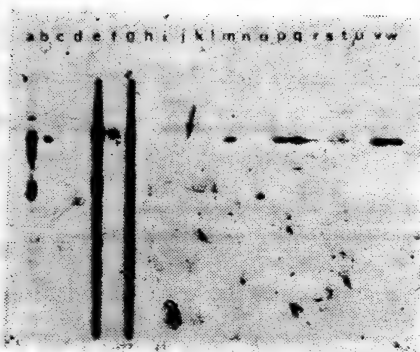


图 3-18 使用两用检出装置所得检出谱

a~b, 使用线粒体免疫的羊血清, a 的稀释度为 1:3, b 为 1:30; c~d, 使用细胞色素氧化酶免疫的羊血清, c 的稀释度为 1:3; d 为 1:30; e~f, 使用大肠杆菌 DNA 结合蛋白质免疫的兔血清, e 为稀释度 1:50, f 为 1:200; g~h, 用 α HM 酵母蛋白质免疫过的兔血清, g 的稀释度为 1:50, h 为 1:200。单克隆抗体实验有: 来自初级杂种瘤培养之上清液(1-0, 稀释度为 1:1)和克隆杂种瘤培养上清液(p、q、u, 稀释度为 1:1)。r~t, 来自未提纯腹水上清液, 稀释度均为 1:100; v 和 w 来自经提纯腹水之上清液, 稀释度分别为 1:10 和 1:100, i、j、k 未加。

此外, 使用这种装置不会产生坑间的扩散污染, 如图 3-18 中 i、j、k 坑未加血清, 均未见其邻近坑有任何血清渗入。

在点印渍时, 先把三张用印渍缓冲液浸湿的普通滤纸放入底盘(IV), 其上放上也用同种缓冲液浸湿的 NC 纸。取具坑盘 II 或 III (视抗原和检验的抗体数而定, 抗原样品数多则用盘 II、反之用盘 III) 插入底盘的插入圈中。把各种抗原样品分别加入各坑中。当 NC 纸稍干后用水洗除未结合抗原, 再用猝灭剂封阻 NC 纸上未结合位点。用另一块具坑盘 III 或 II (前者用 II 时后者用 III; 前者用 III 时后者用 II) 替代前一块板, 紧固后即可在各坑内加入各种抗体制剂。这种方法的检出图谱如图 3-19 所示。可见, 一张 $9 \times 13\text{cm}$ 的 NC 纸上可同时检出 600 余个斑点, 这比常规点印渍的斑点数多出 10 多倍。更重要的是不



图 3-19 使用两用检出装置进行点印渍时的检出谱

需逐滴加样,而是可以逐行地加,这就省时省力许多。由于这种装置的高效率,国外已有相应产品问世,如法国生产的 M70 型 Altuglass(SEBIA, Issy Les Moulineaux, France),其结构和图 3-18 出示的并无两样。

(4) 印渍区带定量使用的电视摄像-微机系统 常规凝胶电泳技术中,因凝胶透明,电泳分离后凝胶中的区带经染色就可在专用密度计中扫描定量。现在,凝胶中的区带转移于固定化纸上,由于各种固定化纸均不透明,就不能用这类密度计扫描定量了。就目前所报道的有关印渍术定量的文献看,大都采用放射性标记,得到放射自显影底片后再对此底片用密度计扫描^[9,30,42~44]。或者从固定化纸上剪下放射性区带再用 γ -计数器计数而定量^[9,30,43]。少数报道则是采用弱激光密度计(Soft laser densitometer),对免疫染色了的 NC 纸直接扫描定量^[45]。显然,这些条件限制了印渍纸上区带的定量检出。

1983 年日本京都大学 Manabe 和 Okuyama 设计了一种电视摄像-微机系统(TV camera-microcomputer system)^[46]。自制一架这种仪器(所有部件均有商品市售)成本不会高于常规密度计(约 4 千美元)。重要的是它既可以用于常规凝胶中区带

的定量^[46]，也能用于固定化纸上区带的定量^[8]。最小检出值达 $0.05\mu\text{g}$ 蛋白质，灵敏度是相当高的。考虑到这种系统很可能成为现有凝胶密度计的换代产品，这里予以简单介绍。

电视摄像-微机系统的组装如图 3-20 所示。一块染了色的凝胶片或 NO 纸被夹在两块玻璃板之间，放在一个荧光灯箱的光源板上。一架黑白电视摄像机固定在支架上。装有 $f=16\text{ mm}$ 镜头和 Y-2 滤色片的镜头对准凝胶或 NO 片。摄像机的放大率可通过改变连接于镜头的延伸管长度来调节。例如长 15 mm 的延伸管就可将 $8\times 6\text{ mm}$ 的 NO 片上图象全部投影于电视显示屏上。视频信号由一架数字转换器使之转化为数字，并和一架微机联系起来。数字转换器可把视频图像分成 256×256 个点，每点又设计成 4 种水平的灰度。转为数字的图象可在触动开关后以 $1/60$ 秒的速度从数字转换器中取得，并由一架电视显示器监视（称为数据监视器）。显示的图像可被存贮于 5 英寸 (12.7 cm) 磁盘内。磁盘驱动器用两个，其一驱动存贮微机程序的磁盘，以

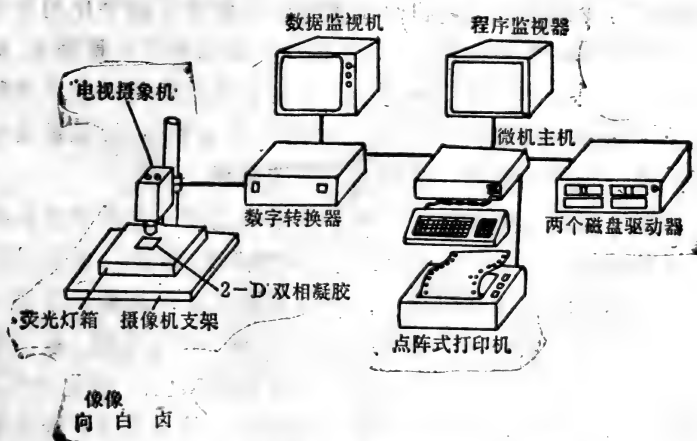


图 3-20 电视摄像-微机系统组装示意图

便控制本系统,另一驱动器存贮数字化图象的磁盘。一张5英寸(12.7cm)的磁盘可以存贮七个数字化图像。控制本系统的程序由微机所附显示屏(称程序监视器)来选择。一架点阵式打印机用作数字化硬拷贝。

本系统所用微机程序软件包已有商品市售。该软件是为操作员和微机、微机和外部接口装置对话而用 Basic 语言写的,共由下列子程序所组成:(1)“ceep”,系为了选择其后子程序所编的引导程序;(2)“save”,读数字转换器中已数字化图像的数据,并把它们贮存于一张磁盘档案中;(3)“load”,读磁盘中的图像数字,并把它们存贮于数字转换器的存贮器中;(4)“data match”,对数字转换器中数字化图象和任何已存贮于盘磁中的这类图像作出比较,包括和电视显示屏上未配以点位置的显示图像进行比较;(5)“demo”,允许操作人员使用一种游标来选择已数字化图像的任何矩形面积,即在所选面积中,用四种灰度——白色、浅灰色、暗灰色和黑色——计算点的数目;(6)“packageII”,令点阵式打印机打出数字转换器中已数字化的图像。

Manabe 和 Okuyama 对此软件包商品作了少量修改,即在“demo”程序中加入两项功能:(1)在点阵计数后计数区带斑点的密度积分,并打印出来;(2)在计算了密度积分后,从被研究的所保留的四种灰度面积中判别出所选面积。

灰度标准是用市售密度标准卡来确定的,这种密度标准卡是一种照相底片,上面有十三种密度渐降的影象。把这种标准卡放在本系统的荧光灯箱上,卡上的图像即可经数字化显示在电视显示屏。通过调节数字转换器上两个可变电阻,就可使四种灰度水平,即白色、浅灰色、暗灰色和黑色,转化为0.04、0.28、0.67和1.32的密度值。因为白色相当于NO纸或凝胶的白色背景,所以其它灰度水平的密度值应减去0.04。这样一

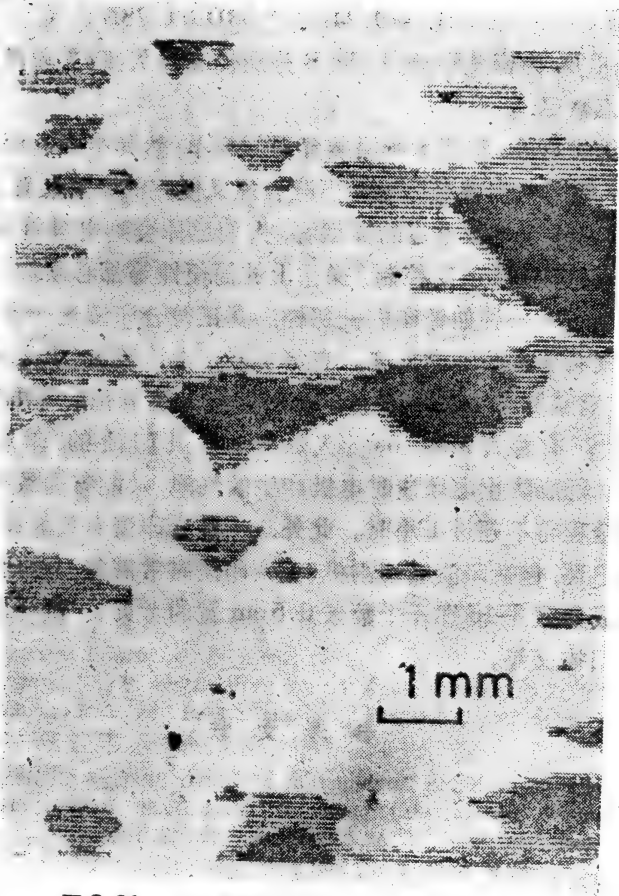


图 3-21 双相凝胶区带经灰度计数等最后得到的微机打印出来的图谱

来,用电视摄像-微机系统对 NC 纸或凝胶上的区带进行定量测定时,微机点阵打印机打出的图像将如图 3-21 那样,每一区带的量则用密度积分(Integrated density)来表示。所谓密度积分是指任一区带中各灰度乘其点计数的总计值,即:

$$I.D. = 0.24L + 0.63D + 1.28B$$

式中, I.D. 为密度积分, L、D、B 分别代表浅灰、暗灰和黑色三水平的点数目。

综上所述, 印渍术所用装置形似简单, 然其中含有深奥的理论, 不理解它们就难以设计出既合理又便宜的印渍装置。尽管如此, 从迄今已报道过的文献看, 人们已体会到电极材料、装置的形式、电压梯度的控制、操作上的简便性等都必须加以改进。可以预言, 一种如像印刷机那样, 真正符合印渍这一名称的印渍装置必将在短期内出现。它将类似于电泳装置(不是电洗脱式), 有着如 Svoboda 设计的那种便宜又抗氧化的导电玻璃作阳极^[9]; 有着如 Manabe 等人那种多考贝印渍的“印刷机”式样^[31]; 既能防止电印渍时电极产生的气泡, 又能省去致冷设备; 印渍全程将不超过 1 小时。此外, 一整套印渍有关的设备也必相继出现, 包括印渍纸切割机(免疫印渍时常需将一张印渍纸一次切成如图 3-16 那样十数条 0.5cm 宽的考贝)、洗涤反应盘、定量扫描仪等。

参 考 文 献

- [1] Gooderham, K., in *Techniques in Molecular Biology* (Walker, J. M. and W. Gaastra, eds.), pp 49~61, Croom Helm., London, 1983.
- [2] Moeremans, M. et al., *Anal. Biochem.*, 153: 18, 1986.
- [3] Frossard, P. et al., *ibid.*, 134: 265, 1983.
- [4] Loeb, M. R., *ibid.*, 143: 265, 1983.
- [5] Gershoni, J. M. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 856: 19, 1986.
- [6] Gershoni, J. M. and G. E. Palade, *Anal. Biochem.*, 131: 1, 1983.
- [7] 范培昌, *生物化学与生物物理进展*, 5: 2, 1986.
- [8] Manabe, T. et al., *Anal. Biochem.*, 143: 39, 1984.
- [9] Svoboda, M. et al., *ibid.*, 151: 16, 1985.
- [10] Bittner, M. et al., *ibid.*, 102: 459, 1980.
- [11] 莽克强等, *聚丙烯酰胺凝胶电泳*, p61, 科学出版社, 1975.
- [12] Southern, E. M., *J. Mol. Biol.*, 98: 503, 1975.

- [13] Southern, E. M., *Enzymol. Methods*, 68: 152, 1979.
- [14] Schaltmann, K. and O. Pongs, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 361: 207, 1980.
- [15] Miskin, R. and H. Soreq, *Anal. Biochem.*, 118: 252, 1981.
- [16] Ohlsson, B. G. et al., *ibid.*, 152: 239, 1986.
- [17] van den Berg, K. J., *ibid.*, 155: 149, 1986.
- [18] Peferoen, M. R. et al., *FEBS Lett.*, 145: 369, 1982.
- [19] Thompson, G. A. et al., *Anal. Biochem.*, 148: 288, 1985.
- [20] Rider, C. C. and C. B. Taylor (范培昌译), *同工酶*, pp. 93~97 科学出版社, 1987.
- [21] Dion, A. S. and A. A. Pomenti, *Anal. Biochem.*, 147: 525, 1985.
- [22] Aubertin, A. M. et al., *ibid.*, 131: 127, 1983.
- [23] Bowen, B. et al., *Nucleic Acids Res.*, 8: 1, 1980.
- [24] Kittler, J. M. et al., *Anal. Biochem.*, 137: 210, 1984.
- [25] Tsang, V. C. W. et al., *ibid.*, 143: 304, 1984.
- [26] Stott, D. I. et al., *ibid.*, 149: 454, 1985.
- [27] Towbin, H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350, 1979.
- [28] Stellwag, E. J. and A. E. Dahlberg, *Nucleic Acids Res.*, 8: 239, 1980.
- [29] Gibson, W., *Anal. Biochem.*, 118: 1, 1981.
- [30] Vaessen, P. T. M. J. et al., *FEBS Lett.*, 124: 193, 1981.
- [31] Manabe, T. et al., *Clin. Chem.*, 28: 824, 1982.
- [32] Manabe, T. et al., *Electrophoresis*, 4: 242, 1983.
- [33] Manabe, T. et al., *ibid.*, 4: 359, 1983.
- [34] Legocki, R. P. and D. P. S. Verma, *Anal. Biochem.*, 111: 385, 1981.
- [35] Schleif, R. F. and P. C. Wensink (章静波等译), *分子生物学实用方法*, pp. 166~171, 人民卫生出版社, 1985.
- [36] Sharon, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 1420, 1979.
- [37] Sternberg, J. and P. Jeppesen, *J. Immunol. Methods*, 64: 39, 1983.
- [38] Victor, C. W. et al., *Enzymol. Methods*, 92: 377, 1983.
- [39] 赵永芳、朱勤, *生物化学与生物物理进展*, 5: 75, 1986.
- [40] Towbin, H. and J. Gordon, *J. Immunol. Methods*, 72: 313, 1984.
- [41] Alric, M. et al., *Anal. Biochem.*, 155: 328, 1986.
- [42] Bartles, J. R. and A. L. Hubbard, *ibid.*, 140: 284, 1984.
- [43] Howe, J. G. and J. W. B. Hershey, *J. Biol. Chem.*, 256: 12836, 1981.
- [44] Loeb, M. R., *Anal. Biochem.*, 143: 196, 1984.
- [45] Domin, B. A. et al., *ibid.*, 136: 390, 1984.
- [46] Manabe, T. and T. Okuyama, *J. Chromatogr.*, 264: 435, 1983.

第四章 实验技术

不论核酸印渍还是蛋白质印渍,除检出步骤差异较大外,其它实验步骤和技巧都大同小异。因此,本章在较具体介绍各种印渍物检出方法的同时,将原则性地讨论检出前各步的实验技术。印渍术发展极为迅速,已有大量文献报道,从中不难找到所需研究的生物分子的印渍条件。为了读者方便,本章也将用表格形式列出近百种生物大分子的印渍条件供参考。鉴于印渍各步骤的影响因素,有一些已在原理一章中讨论过,为省篇幅,凡已提过的本章不再论及。

印渍术的重点虽在于某种感兴趣分子的特异性检出,但印渍区带的全谱检出也是需要的。例如作者在研究人红细胞膜阴离子交换蛋白的结构与功能中^[1~5]体会到,用经典方法染色显现凝胶上膜蛋白分离区带,染色加脱色全程需10天^[1,5]。改用凝胶电泳后再印渍,虽增加了数小时的印渍步骤,但其后仅需10分钟的染色和脱色步骤,全程不到一天。据此,本章还将介绍印渍纸上全谱检出的染色技巧。

一、印渍模板的选择与加工

除点印渍外,常规印渍术几乎都是用各种凝胶电泳后所得凝胶作为印渍模板(Blotted template)。如所周知,凝胶电泳已经成为当代鉴定各种生物大分子特性及其纯度的主要工具。它的高分辨率,以及既能用于分析又能用于制备,设备可简可繁

等实用性,使它的发展至今不衰。从某种意义上说,生物大分子印渍术实是凝胶电泳发展至今的又一产物。所以,要想完善地掌握印渍术的实验技巧,首先应该掌握凝胶电泳技术。鉴于凝胶电泳已有许多专著^[6~9],这里只讨论如何获取作为印渍模板的凝胶,以及如何处理使之达最大印渍效率。

从第二章中可知:印渍效率和凝胶的厚度和孔径有关;和电泳分离分子的性质、大小和上样量有关;也和电泳时所用样品的增溶剂、变性剂等有关。表观上,目前似能小结出如下几点:(1)板形凝胶比圆管形凝胶更易印渍^[10];(2)即使采用板形凝胶,也是胶片越薄越易印渍^[11];(3)处于等电点状态的生物分子难以用电印渍法印渍^[12];(4)在一定凝胶孔径和印渍时间下,分子量越大的分子越难印渍完全^[13];(5)在过长印渍时间下,较小分子量的物质将穿透固定化纸造成损失而得低印渍效率^[14];(6)电泳上样量必须适当,过多将因超过固定化纸结合容量而损失,过低又将使印渍纸上区带微弱^[15];(7)凝胶中存在增溶剂等会影响印渍效率,如 SDS 有利于电印渍效率^[16~18]、6M 脲能改善大分子量蛋白质迁出凝胶^[19]、补骨脂素(Psoralen)可提高限制酶切 DNA 片段的印渍效率^[20]等。

要想获得优良的印渍模板,上述各项必须认真考虑,但其中不乏矛盾之处。例如,凝胶孔径越大越易印渍,若据此而任意加大凝胶孔径势必丧失凝胶电泳原有的高分辨率。又如,分子量越大的分子越难迁出凝胶,于是加长印渍时间,此时处于同片凝胶中的小分子物质必将因此穿透印渍纸而损失一大部分。凡此种种都说明需用辩证法则,灵活地使用各种技巧来获取最佳状态的印渍模板。下列各项建议和实验也许能给我们许多启迪。

1. 按照印渍目的制取印渍模板

一般说来,生物大分子印渍术的检出目标可归为下列三类,

各类对印渍模板的要求也有差异。

(1) 定性检出印渍全谱及其中所含某些感兴趣的特异性功能分子。例如, Gershoni 等人^[21]为了探究人红细胞膜上是否存在有仙台病毒的受体蛋白, 他们用 SDS-10% PAGE 分离人红细胞膜蛋白, 并用此板形凝胶作为印渍模板, 电印渍于 NO 纸上。把印渍纸一分为二, 一份用考马斯亮蓝染色显现全谱, 另一份用 ^{125}I 标记的仙台病毒作探针与之印盖, 结果放射自显影谱上只显一条区带。和全谱对照, 此区带是血型糖蛋白 A (Glycophorin A)。为了进一步验证, 他们再用麦胚凝集素亲和柱提纯血型糖蛋白 A, 然后重复上述电泳分离和电印渍。此时全谱检出只有血型糖蛋白一条区带。再用 ^{125}I -标记仙台病毒印盖检出也只显一条区带, 二者迁移位置完全相同。由此得出结论: 仙台病毒在人红细胞膜上的受体是血型糖蛋白 A^[21]。这项实验表明, 它是定性检出, 可以不考虑印渍效率, 也不考虑较小分子量的物质是否会穿透 NO 纸而造成的部分损失。对于这种定性目的而言, 印渍模板要求不严格, 只要凝胶中的区带数能一个不漏地转移于 NC 纸就算达到目的, 至于转移了多少量可以不管。为此, 任何凝胶均可作为印渍模板(但凝胶电聚焦的凝胶不可用电印渍), 重要的是控制印渍时间, 通常以最大分子量区带能转移 50% 左右的时间为好。

(2) 定量检出某一或二种感兴趣的特异性功能分子。例如, Bartles 和 Hubbard^[22]在定量检出血清粘蛋白液所含麦胚凝集素特异性糖蛋白的实验中, 先把样品用 SDS-7% PAGE 分离, 电印渍于 NC 纸。为了确定分子量, 在平行印渍实验中使用了 26~220 千道尔顿(kDa)的蛋白质标准分子量系列。印渍纸经猝灭后用 ^{125}I -麦胚凝集素印盖。最后得到的放射自显影谱用 Hoefer GS 300 型密度计扫描定量。结果表明在 43000 和 94000

Da(道尔顿)处有两条区带。经用抑制剂处理证明一条是糖链末端为 N-乙酰葡萄糖胺的糖蛋白, 另一条是具唾液酸末端的糖蛋白, 前者含量比后者大 3.2 倍^[22]。由此实验可知, 其实验目的不在于全谱检出, 虽要求定量, 但区带数不多。而且, 在整个 26~220 kDa 范围内欲检出的两条区带集中在 40~94 kDa 区域, 据此所选印渍模板及印渍条件应能保证这两条区带达到最大印渍效率(90%以上)。至于在此条件下, 较高和较低分子量的区带能否转移或有否损失等都不必考虑。为了做到这一点, 必须进行一些预备实验: 首先, 用上述第(1)项办法定性地确定检出区带在何位置; 其次, 在尽可能不下降电泳分辨率的前提下, 加大这两条区带的凝胶孔径; 第三, 确定能达最大印渍效率的印渍时间和条件; 第四, 验证印渍效率是否确实达到最大值, 此时需对印渍后的凝胶用高灵敏度染料(如银染料)染色, 看此两条区带是否还有残留。还必须在印渍时叠放几张印渍纸, 并在印渍后分别染色。看看这两条区带是否只印渍在第一张 NC 纸上, 还是尚有部分穿透并印渍于第二、甚至第三张印渍纸上, 若有, 定量时也可补入此数。

(3) 全谱定量检出。例如 Loeb^[23] 为了探测革兰氏阴性菌露于细胞表面的成分, 把流感嗜血杆菌 b (*Haemophilus influenzae* b) Eag 株的外膜, 用 SDS-PAGE 分离后电印渍于 NC 纸。把 NC 纸纵切成 0.5 cm 宽的 10 等分条。其中两侧的两条(图 4-1C)和印渍前(A)及印渍后(B)的凝胶, 同时用考马斯亮蓝染色。可见凝胶(A)上的区带至少有 10 条(用英文字母表示, 其中 l 为脂多糖), 它们全被印渍于 NC 纸(C), 印渍后的凝胶(B)没有显现任何区带也说明印渍是完全的。另外 8 条 NC 纸经猝灭步骤后, 用各种变株吸附过的 Eag 株全细胞抗血清免疫印盖, 再用 ¹²⁵I-A 蛋白与之反应。在放射自显影后用 LKB

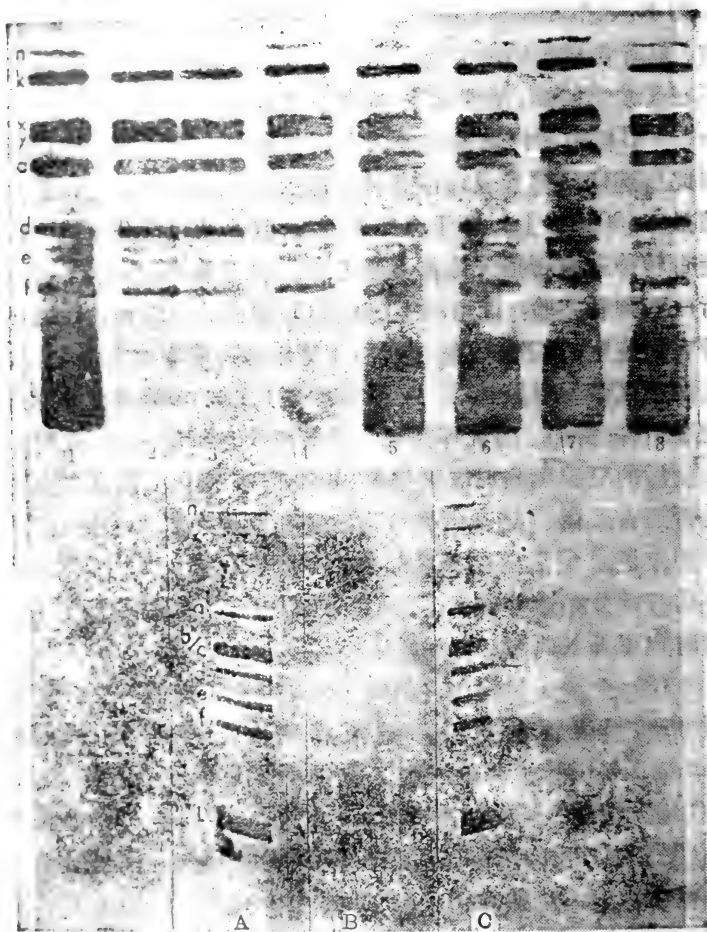


图 4.1 流感嗜血杆菌 b 型 E_{ag} 株外膜上露于细胞表面成分的定量印渍
A~C, 考马斯亮蓝染色谱; 1~8, 各种变株全细胞抗血清和 ^{125}I -A
蛋白免疫检出的放射自显影谱。说明见正文。

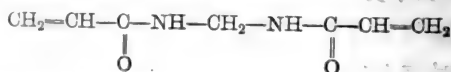
2202 型激光密度计扫描定量, 可得图 4-1 中 1~8 的结果。表明 Eag 株抗血清除 b/c 区带外, 能和所有的外膜蛋白质和脂多糖结合(图 4-1 之 1 列, 试与 A 列比较), 其中含量很少的 x 和 y 区带(难以用考马斯亮蓝显现, 见 A 列)经免疫印盖后也能强烈结合而显现(列 1)。如果这种 Eag 株抗血清先用生活的 Eag 菌株吸附, 再去免疫印盖外膜蛋白印渍谱(图 4-1 之列 2), 那末印渍谱上的 n 和 L 区带消失了, 这就证明这两种成分——n 蛋白和脂多糖是露在胞外的成分。定量测定又表明区带 k 含量下降(比较列 1 和 2), 说明抗血清中有部分针对 k 蛋白的抗体被 Eag 生活株吸附除去了。列 3 是用缺失被膜的 Eag 变株和 b⁻S2 株吸附过的 Eag 抗血清去免疫印盖外膜蛋白印渍谱的结果。此谱和列 2 几乎相同, 这就证实了上述结论。列 4~8 是分别用 Eag 株的另一些变株——G5、C47、C54, 以及大肠杆菌 B 和 KL16 吸附过的 Eag 抗血清去印盖同种印渍谱所得结果。其中除 G5 除去了抗血清中的脂多糖外(列 4), C47 和 C54 (列 5 和 6)只除去部分 n 蛋白。这又表明, Eag 株中脂多糖和 n 蛋白露出胞外的区域, 只和某些流感嗜血菌的 b 型株起交叉反应。两株未加工过的大肠杆菌没有吸附去 Eag 抗血清中任何区带(列 7 和 8), 说明大肠杆菌露于表面的决定簇不和流感嗜血杆菌起交叉反应^[23]。

上述实验要求能定量地检出印渍全谱, 这是比较困难的。Loeb 承认, 上述实验重复过 12 次, 所得各区带的定量数据有一些变化, 也承认小分子的脂多糖因穿透 NC 纸造成部分损失^[23]。显然, 要想使几十万分子量和不满一万分子量的分子在一种凝胶孔径下同时完全转移而又不会损失, 这是很难做到的。最好的办法是改用浓度梯度凝胶作为印渍模板。Manabe 等人在印渍人血清蛋白质时采用了双相电泳^[24], 第一相用 pH4~8 的凝胶

电聚焦(PAGEF), 第二相用 4~17% 的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳(PGGE), 在电印渍时以梯度凝胶为模板。因各种大小的分子均处于其相应大小孔径的凝胶区域中, 故电印渍仅 1 小时, 就使 28 种血清蛋白质完全转移, 这就克服了分子大小对印渍速率造成的影响^[24]。当然, 在非梯度凝胶作模板的印渍中, 也可在印渍时叠放数张印渍纸, 然后以最高分子完全转移作为印渍条件, 印渍后总计各印渍纸上区带量也能达到精确定量的目的^[15]。但是这种办法没有采用梯度凝胶那样方便, 印渍时间也将增加许多。值得提出的是, 正如 Manabe 等人所指出的^[24], 用梯度凝胶作印渍模板时, 较小分子量的蛋白质尽管处于小孔径凝胶区段, 但迁移仍较快(见图 2-4), 各种分子量蛋白质迁出梯度凝胶的峰曲线也有差异(图 2-4)。为此, 要想精确定量最好在采用梯度凝胶作为印渍模板的同时, 再叠放数张印渍纸。也就是说把上述两法组合起来。此外, Elkon 等人指出^[19], 加有琼脂糖的常规凝胶, 既能改善凝胶的机械性能、提高印渍效率, 又不会影响原有电泳分辨率。但是, Elkon 等人这种看法是针对使用大孔凝胶作为印渍模板而言的。

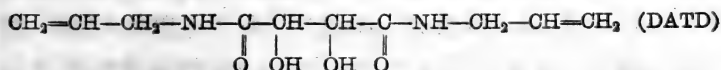
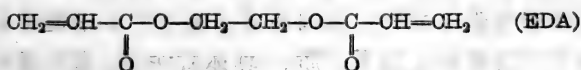
2. 印渍模板的解聚

为了克服高分子量生物分子因凝胶孔径位阻难以迁出凝胶而完全印渍的困难, 人们想出了许多办法, 其中之一是在印渍前先把凝胶解聚^[18, 25, 26]。常规聚丙烯酰胺凝胶的铸造是采用甲叉双丙烯酰胺(*N, N'*-Methylenebisacrylamide, 简称 MBA)作为交联剂:

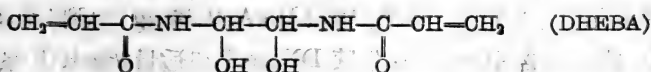
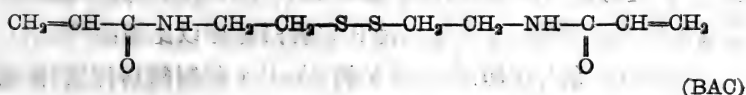


MBA 只能在非常苛刻的条件下, 例如在 50° 或 30°C 下用 30% H₂O₂ 才能溶解^[27], 显然这是生物分子经受不了的。过去, 曾

有人建议改用二丙烯酸乙酯 (Ethylene diacrylate; 简称 EDA)^[28] 和二丙烯基酒石酸胺 (*N, N'*-Diallyltartardiamide; 简称 DATD)^[29], 二者结构式如下:



EDA 中的酯键可被强碱水解; DATD 所含 1, 2-乙二醇结构可被过碘酸氧化裂解。前者对生物分子不合适, 后者尚可。因此印渍术中有人采用 DATD 作为交联剂, 并在印渍前用过碘酸处理凝胶, 使凝胶解聚释放出高分子量的区带。七十年代中期, 有人又提出了两种交联剂——双丙烯酰光胺 (Bisacrylyloystamine; 简称 BAO)^[30] 和二羟乙撑双丙烯酰胺 [*(N, N'*-(1,2-Dihydroxyethylene) bisacrylamide; 简称 DHEBA)^[31]]:



BAO 中含有二硫键, 可溶于巯基乙醇; DHEBA 中既含有对过碘酸敏感的 1, 2-乙二醇基团, 又含有碱可裂解的酰胺羧甲基键。由于这两种交联剂能在大多数生物分子经受得住的条件下裂解而被应用于印渍术。两种可被过碘酸裂解的交联剂——DATD 和 DHEBA 的具体操作可参看 Tas 等人的报道^[32]。简言之, 当用这两种交联剂分别和丙烯酰胺制成的凝胶作为印渍模板时, 可在印渍前用 10mM 过碘酸 (20ml/4cm² 胶片) 浸泡凝胶适当时间 (勿使全溶), 再用水漂洗一下即可印渍。

3. 印渍模板的酶解

使印渍模板中所含高分子量生物分子经水解酶类有限水解为较小分子,也是加速大分子迁出凝胶而印渍的办法之一。

Gibson 在印渍被巨细胞病毒(Cytomegalovirus)感染的人包皮成纤维细胞核分部所含蛋白质的实验中^[26],用链霉菌蛋白酶有限水解了印渍模板上的蛋白质。具体做法是,蛋白质样品经 14% PAGE 分离,取下凝胶放入如图 3-8 所示电印渍夹层中。凝胶的阴极侧放三张事先用内含 25~70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉菌蛋白酶的印渍缓冲液(0.1% SDS 25 mM Tris、192 mM 甘氨酸)浸湿的普通滤纸。电印渍时,滤纸上的蛋白酶在电动力下迁入凝胶中,使其中蛋白质有限水解后再转移到 NC 纸上。Gibson 的这一实验证明,145kDa 的蛋白质区带在 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 酶量作用下,印渍效率要比无酶处理对照提高 10 倍。若酶量增大到 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,印渍效率更比对照增大到 23 倍。他还指出,其它蛋白酶也有同样效果,但链霉菌蛋白酶抗去污剂(如 SDS)、分子较小易进入凝胶,以及价格也较便宜,这些优点是其它蛋白酶难以比拟的^[26]。

Bittner 等人在印渍 λ DNA 的 *EcoR* I 限制酶切片段中也应用了酶消化^[13]。他们把 ^{32}P 标记的 λ DNA (2.33 μg) 加到 35 μl 的酶液中,此液内含 40 ng/ml 牛胰 DNase I 和适量 *EcoR* I,系用 100 mM Tris-HCl (pH 7.8)、10 mM MgCl_2 和 1 mM EGTA 配制,反应在 37°C 下进行 15 分钟。此时 *EcoR* I 把 λ DNA 切成片段, DNase I 使双链片段产生切口。加入 50 μl 中性酚并在旋涡混合器上混合使反应终止。处理后的样品经 0.75% 琼脂糖电泳,然后把凝胶用碱处理使双链 DNA 解链,再电印渍于 DBM 纸。实验结果表明,用 DNase 处理过的高分子量 DNA 片段印渍效率达 93%,而未用酶处理的对照仅为 36%^[13]。

4. 印渍模板的理化修饰与平衡处理

对某些作为印渍模板的凝胶进行适当的化学修饰也常能提

高印渍效率。例如,通常认为用等电点聚焦电泳分离的蛋白质,将在凝胶中均处于等电点状态。用这种凝胶作为印渍模板时,若用电印渍法,就只有那些因印渍缓冲液 pH 影响使之脱离等电点态的蛋白质可以转移外,仍处于等电点态以及在等电点处已沉积的蛋白质则不能转移^[12]。Johnson 等人用 pH7~9 的凝胶电聚焦分离了 ^{125}I 标记的多瘤病毒的蛋白质^[33]。考虑到常规的凝胶电聚焦所用凝胶网孔还不够大,可能会影响电印渍效率,于是他们在凝胶中加入 0.1% 的琼脂糖来增大网孔。但是他们的实验结果表明,用此凝胶在 pH6.8 的印渍缓冲液中进行电印渍,印渍效率仍很差,尤其是在此条件下仍处于等电点态的酸性蛋白质。为此,他们把此凝胶浸入 100ml SDS 缓冲液 (2.3gSDS, 0.75gTris, 8ml 甘油, 0.5ml β -巯基乙醇, 90ml 蒸馏水, 用 HCl 调 pH6.8), 并在室温下摇荡 30 分钟, 然后在标准印渍缓冲液 (24mM Tris, 192mM 甘氨酸, 20% 甲醇, pH8.3) 下电印渍于 NC 纸。结果表明经 SDS 处理后的凝胶中所有多瘤病毒的结构蛋白质全被完全转移了 (参看图 2-12 和 2-13)^[33]。且证明, 这些蛋白质虽经 SDS 处理, 却仍保持着抗原活性 (图 2-13)。他们认为, 用 SDS 修饰印渍模板使原来处于等电点态的蛋白质都形成了带负电的 SDS-蛋白质复合物, 从而能在 pH 8.3 的条件下单方向地电印渍于放在凝胶阳极侧的 NC 纸上。为了进一步验证这一结论, Johnson 等人又用 0.9M 乙酸-6.25M 脲-15% PAGE 分离 ^{125}I 标记的多瘤病毒蛋白质, 然后以此凝胶作为印渍模板进行电印渍。由于这种乙酸-脲凝胶分离的蛋白质在 pH6.8 印渍缓冲液中各具不同的 pK 值, 因此电印渍时有的迁向阴极, 有的迁向阳极。也就是说需在凝胶的两侧各放一张印渍纸。电印渍的结果产生了两张互补的印渍谱, 故谓之双方向印渍 (Bidirectional blotting)。为了使乙酸-脲凝胶

这类印渍模板能实现单方向印渍, Johnson 等人也把此凝胶用 SDS 修饰,使所有蛋白质和 SDS 形成复合物而带负电。此时再在 pH8.3 的条件下电印渍,则所有蛋白质都能单方向地印渍于凝胶阳极侧的 NC 纸上了^[33]。

补骨脂素(Psoralen)在临床上用于治疗光化性皮炎或色素沉着的皮肤疾病。它象其它多环芳香烃化合物(如吡啶橙、溴乙锭、放线菌素等)那样,在暗中可以嵌入 DNA,然后在近紫外光($\sim 360\text{nm}$)照射下激发并共价结合于 DNA 的嘧啶碱。补骨脂素不仅能和双链 DNA 形成复合物,也能和单链 DNA 或 RNA 形成复合物^[34]。因此补骨脂素及其衍生物常被用作研究染色质结构的光化学探针^[35],以及测定 DNA 和 RNA 的二级结构动力学^[36]。Frossard 等人根据补骨脂素上述性质,把其衍生物——4, 5', 8-三甲基补骨脂素(TMP)加入凝胶中,从而提高了长度为 50~500bp 的 DNA 片段的印渍效率^[30]。他们的做法是,在铸造 7% 聚丙烯酰胺板形凝胶中,加入适量的 TMP 乙醇溶液($120\mu\text{g}/\text{ml}$),再用这种凝胶分离经 *Hae* III 限制性内切酶消化的 pBR 322 质粒 DNA 片段。电泳后,凝胶浸入 0.5M NaOH-1.5M NaCl 溶液中 30 分钟,使双链 DNA 片段解为单链。再把凝胶浸入 1M Tris-HCl, 3M NaCl (pH7.4) 溶液中 30 分钟使碱中和。以上步骤均在暗中进行。中和后凝胶在自然光下曝光 30~60 秒。用它作为印渍模板,于 50mM Tris-HCl, 50mM 硼酸盐、2mM EDTA (pH8.3) 印渍缓冲液中,30V 下对 NC 纸电印渍 3 小时。正如图 4-2 所示,未加 TMP 的对照(A 列)中 124bp 长的 DNA 片段印渍很差,被印渍的区带数也很少。然而加有 $250\mu\text{g}/100\text{ml}$ PAG 量 TMP 的凝胶(B 列),89~124bp 长的 DNA 都能很好印渍,而且随着 TMP 浓度之增加,最小的长 64bp 的 DNA 片段也能显现出来,区带数目也增

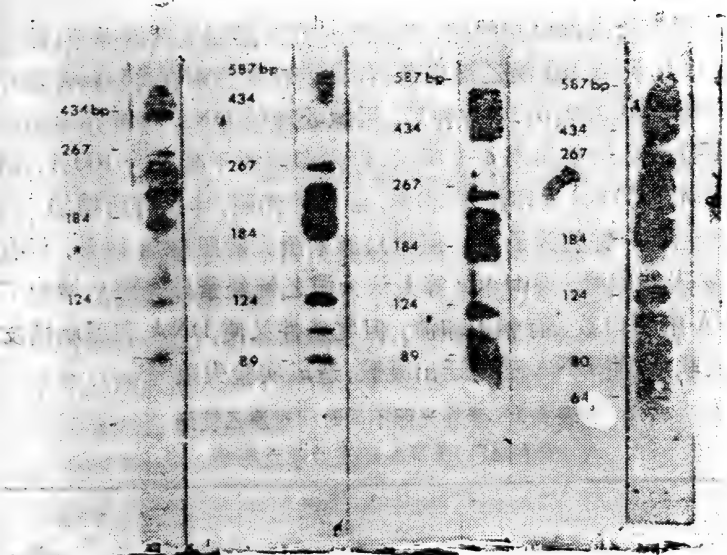


图 4-2 TMP 对长度为 50~500bp DNA 片段印渍效率之影响

A, 不加 TMP; B~D, 分别在 100ml 丙烯酰胺
溶液中加 250 μ g、400 μ g 和 1000 μ g。

加许多(O, D 列)^[20]。Frossard 等人认为, TMP 所以能提高 50~500bp 这么小的 DNA 片段之印渍, 是由于 TMP 使 DNA 小片段交联成较大网络而不致穿透 NC 纸。他们用更高浓度的 TMP 实验证明, 同样大小的 DNA 片段在此条件下又难转移了, 认为高浓度的 TMP 导致小片段交联成更大网络而难迁出凝胶^[20]。

Bittner 等人在印渍 47 kb(千碱基)长的 DNA 实验中, 也做过类似上述的工作^[18], 但他们是用溴乙锭。因为凝胶中的 DNA 经溴乙锭染色后若用紫外光照射, DNA 将被引入切口^[37]从而提高 DNA 大片段的转移。Bittner 等人根据这一设想, 把 ³²P 标记的 λ DNA(47kb)片段经 0.75% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳

后的凝胶切成2cm宽的条,其中之一放在滤纸上直接吸干,其它5条用0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溴乙锭染色。各染色胶条分别在254nm紫外光下曝光0、1、2、5、10分钟后,用碱处理使DNA解链并电印渍于NC纸。结果如表4-1所示,以未印渍的干凝胶为100%,则未照光的(0时)只印渍了22%,经紫外光照,印渍有所增加,且以照光5分钟处为最高,但也只比未照光对照增加14%,仍有64%未被印渍。Bittner等人认为溴乙锭经紫外光照后增加了DNA中切口数,有利于印渍,但此条件又使DNA和琼脂糖发生交联,致使DNA难以迁出凝胶,造成实验失败^[13]。

表4-1 紫外光照不同时间对溴乙锭染色的47kbDNA印渍效率之影响

紫外光照时间(min)	结合于NC纸的DNA(cpm)	被印渍的DNA%
0	338	22
1	238	15
2	524	35
5	541	36
10	450	30
干凝胶	1485	100

综上所述,正确选择和加工印渍模板是生物大分子印渍术比较关键的步骤之一。通常把电泳后用作印渍模板的凝胶进行各种加工,包括防止凝胶在印渍时因盐浓度改变而涨或缩,从而预先用印渍缓冲液浸泡凝胶的步骤在内,统称为印渍模板的平衡处理。这类平衡处理常因印渍目的而有不同,也因被印渍的材料不同而有差异。例如有人为防SDS和DBM纸上的重氮基团发生作用,平衡处理时就要除去SDS-PAGE后凝胶中的SDS^[38];有人则为了把电聚焦凝胶中的区带能被电印渍,而在平衡处理中添加SDS^[33]。二者形似矛盾,但都有利于印渍。这就

充分表明必需按需要灵活应用,切不可死搬硬套,也只有这样才能获得最大成功。

二、印渍用纸的选择与加工

迄今已有多种印渍用纸被用来成功地印渍各类生物大分子。优良的印渍用纸应具有下述性质:(1)对生物大分子具有较大的结合容量;(2)和生物大分子结合牢固,不会因各种保温、洗涤等处理而使大分子脱落;(3)结合于印渍纸上的生物大分子不因印渍而失活,应能保持大分子原有的可杂交性、免疫反应性或分子间可作用性;(4)具一定孔径,能使液流或电子流通过以实现印渍;(5)理化性质稳定,不因各种酸碱度缓冲液的处理而破解;(6)具有一定的机械强度,经得起加热、振荡等处理;(7)可长时间贮藏不变质;(8)易于染色;(9)能印渍各种生物分子;(10)价格便宜,使用方便。

显然,要使某种印渍用纸集上述性质于一身,就目前的技术条件而言还难达到。例如,NC纸价格便宜使用方便,具有一定的机械强度,理化性质也较稳定,是印渍术中应用最广泛的固定化材料。但其结合容量($80\mu\text{g}$ 蛋白质/ cm^2)比不上 ZB 纸($480\mu\text{g}$ 蛋白质/ cm^2)。就 DNA 印渍术而言它只能印渍单链 DNA,而不能像 ZB 膜那样还可印渍双链 DNA^[39]。再说,NC 纸是和生物分子非共价结合,它也没有那些能和生物分子共价结合的重氮化纸(如 DBM 纸)那样牢固结合生物分子。ZB 膜和 DBM 纸也有自身的弱点,前者具有众多的阳离子只适于印渍带阴离子的生物分子;后者使用前要重氮化,没有 NC 纸那么方便。凡此种种,都说明必须按印渍目的选择合适的印渍用纸,才能达到最佳印渍效果。

需要提出的是, 印渍用纸的选择也和所选用的印渍方式有关。例如, 采用毛细作用或扩散作用印渍方式, 宜选用较大孔径的印渍纸(如平均孔径为 $0.45\ \mu\text{m}$ 的 NC 纸), 这样可加快印渍速率。如果选用电印渍方式, 则宜采用较小孔径的印渍纸(如平均孔径为 $0.1\ \mu\text{m}$ 的 NC 纸)^[40]。因为这种小孔径并不影响电子流的通过, 却能防止小分子量生物分子因穿透印渍纸而造成的损失。这也说明, 生物大分子印渍术中除了按印渍用纸所具性质选用外, 还必须考虑同种印渍用纸所具孔径这一参数。

1. 硝酸纤维素纸

硝酸纤维素纸(NC 纸)也称硝酸纤维素膜^[41]。这是一类硝酸酯化了的纤维素薄膜。它能在有机溶剂混合物(如乙醚-乙醇或乙酸-丙酮)中增溶, 并通过蒸发去溶剂成为凝胶状而制得。干燥过程的条件控制, 如温度、时间等, 就决定了 NC 纸所具孔径之大小。在印渍术中, NC 纸的孔径是一重要参数。所指孔径是指横越 NC 纸的, 弯弯曲曲不规则长通道的平均有效孔径。例如 $0.45\ \mu\text{m}$ 的 NC 纸, 所具孔的平均密度达 $450 \times 10^6/\text{cm}^2$ 。也就是说, 孔的总面积约占 NC 纸总面积的 80% 左右。NC 纸最初被用作超滤膜, 用来机械筛分大小如细菌之类的颗粒。由于这类筛分是使颗粒停留在 NC 纸的表面或近表面处, 故在超滤的术语中被称为“表面滤纸(Surface filter)”^[42]。鉴于印渍术中生物大分子是通过疏水力等非共价“吸附”而和 NC 纸相互作用(详见第二章原理部分), 生物大分子既在表面被吸附, 也进入内部, 故被称为“深度滤纸(Depth filter)”^[43]。可见, 称呼虽不同, 实为同种材料, 只是前者常制成圆片状, 后者常制成四方形。

NC 纸已有众多的商品市售(表 4-2), 通常可在 4°C 下保存一年。Nathew 指出^[40], 不同牌号 NC 商品的印渍效果有一定

表 4-2 印渍术中常用 NC 纸商品

名称或代号	生产单位	印渍过的 NC 纸孔径(μm)	文献
硝酸纤维素纸	浙江黄岩人民化工厂; 上海医工院	0.22	[44]
BA 85	Schleicher & Schüell Inc., Dassel, West Germany	0.45	[45~48]
		0.30	[40]
		0.20	[11]
		0.10	[20]
BA 83	同上	0.20	[33]
Millipore NC 25HAWP	Millipore Ltd., Mississauga, Ontario, Canada	0.45	[40, 48]
Bio-Rad No. 162-0115	Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA	0.45	[49]

差异。他在 DNA 印渍中发现, Schleicher & Schüell (S&S) 的产品比 Millipore 的同类产品有高出好几倍的检出灵敏度。Faub 等人对此亦有同感^[47]。Towbin 等人的实验表明, Millipore NC 纸的结合容量仅有 $15\mu\text{g}$ 蛋白质/ cm^2 ^[48], 而纯净的 NC 纸应有 $80\mu\text{g}$ 蛋白质/ cm^2 的结合容量。Gershon and Palade 总结性地指出^[43], NC 纸中混有乙酸纤维素时结合容量下降, Millipore 产品正是因为它的存在而影响了印渍效果。朱运松等人比较了上海医药工业研究院生产的 NC 纸和 S & S 产品, 认为二者具有相同的印渍效率和检出灵敏度^[44]。

NC 纸使用极为方便, 印渍时只需将 NC 商品裁成印渍模板同样尺寸, 经印渍缓冲液浸湿即可装入印渍夹层中。NC 纸呈乳白色, 并有正、反两面, 正面光滑, 反面较粗糙。浸泡时, 应把正面对着液面, 先任其漂浮于液面短时间, 然后再把它浸没于溶液中。印渍时也应把 NC 纸的正面紧贴于凝胶, 层间严防夹有气泡。在 SDS-PAGE 作模板的电印渍中, NC 纸若处在 pH 8.0

以上缓冲液中也带负电,应把它放在凝胶的阳极侧^[48]。

Lin 和 Kasamatsu 曾研究过不同孔径 NC 纸的印渍效率^[40]。他们把 ^{125}I 标记的蛋白质分子量标准系列($\text{Mr}=14.3\sim 68\text{kD}$, 共六种)用 SDS-15%PAGE 分离,然后把凝胶一分为五,其中四块叠放两张 NC 纸进行电印渍(250 mA, 4 小时)。紧贴凝胶的第一张 NC 纸分别采用 0.45、0.3、0.2、0.1 μm 四种孔径,并取名为 N1;其后叠放的另一张 NC 纸均用 0.45 μm 孔径,并取名为 N2。印渍后各组 N1 和 N2 分别进行放射自显影,并用 γ 计数器求得各印渍区带的放射性。正如表 4-3 所示,68kD 的多肽难以迁出凝胶,也不会穿过 0.45 μm 孔径的 NC 纸。30~40kDa 的多肽印渍效率有所提高,它们能穿透 0.45 μm 孔径的 NC 纸而不能穿透 0.3 μm NC 纸。小于 20kDa 的多肽较容易迁出凝胶,但也容易穿透 0.45 μm NC 纸。在电泳 4 小时后,18.4 和 17.5kDa 的多肽总共损失了 20% 左右,直到改用 0.2 μm 孔径的 NC 纸印渍它们才不能穿透;最小的 14.3kDa 多肽若用 0.45 μm NC 纸印渍,损失高达 40%。即使改用 0.3 或 0.2 μm NC 纸也将损失 20% 和 11%,必须采用 0.1 μm 孔径的 NC 纸才能达到 95% 左右的印渍效率。从表 4-3 的实验结果不难看出,在分子量为 14.3~68kDa 范围内,若采用电印渍法,则采用 0.1 μm 的 NC 纸较好。

在印渍原理一章中已提及,生物大分子和 NC 纸是非共价结合。如果想使生物大分子和 NC 纸共价结合,可以采用双功能交联剂。Kakita 等人曾采用 *N*-羟基琥珀酰亚胺基-*p*-叠氮苯甲酸盐这种异质双功能交联剂,使蛋白质和 NC 纸共价交联^[49]。Kay 等人则用常规双功能试剂——戊二醛使蛋白质共价交联于 NC 纸^[50]。

至今仍然认为, RNA 不能和 NC 纸相结合^[49, 51], 因此尚未

表 4-3 各种孔径 NC 纸印渍各种分子量蛋白质的效率(%)

被印渍 蛋白质的 Mr ($\times 10^{-3}$)	NC 纸孔径(μm)			
	0.45	0.3	0.2	0.1
	G N1 N2 (T)	G N1 N2 (T)	G N1 N2 (T)	G N1 N2 (T)
68	73 27 0 (100)	64 36 0 (100)	62 38 0 (100)	69 31 0 (100)
40	62 37 1 (100)	57 43 0 (100)	52 48 0 (100)	57 43 0 (100)
30	28 71 1 (100)	28 72 0 (100)	27 73 0 (100)	30 70 0 (100)
18.4/17.5	7 67 6 (80)	12 86 2 (100)	5 95 0 (100)	9 91 0 (100)
14.3	3 51 5 (59)	3 75 2 (80)	4 85 <1 (89)	4 94 <1 (98)

G 为印渍后凝胶中还残留的放射性百分数; N1 和 N2 为叠放的两张 NC 纸上印渍了的放射性百分数; (T) 为 G+N1+N2 总和。

见用 NC 纸印渍 RNA 的报道。

2. 化学活化纸

生物大分子印渍术中也可采用化学活化纸作为印渍用纸。如所周知, 琼脂糖在碱性条件下用溴化氰处理可以引入活泼的“亚氨基碳酸盐”, 从而使得琼脂糖具有能和生物分子发生共价键合反应的功能团。这种反应称为化学活化, 被活化的琼脂糖称为活化型琼脂糖。同样原理, 把纤维素滤纸用化学处理引入活泼的功能团, 使之能在印渍中和生物大分子共价键合的印渍用纸, 称为化学活化纸(Chemically activated papers)^[52]。就目前已报道过的印渍用纸中属于化学活化纸的有两类: 重氮化纸和溴化氰活化纸。

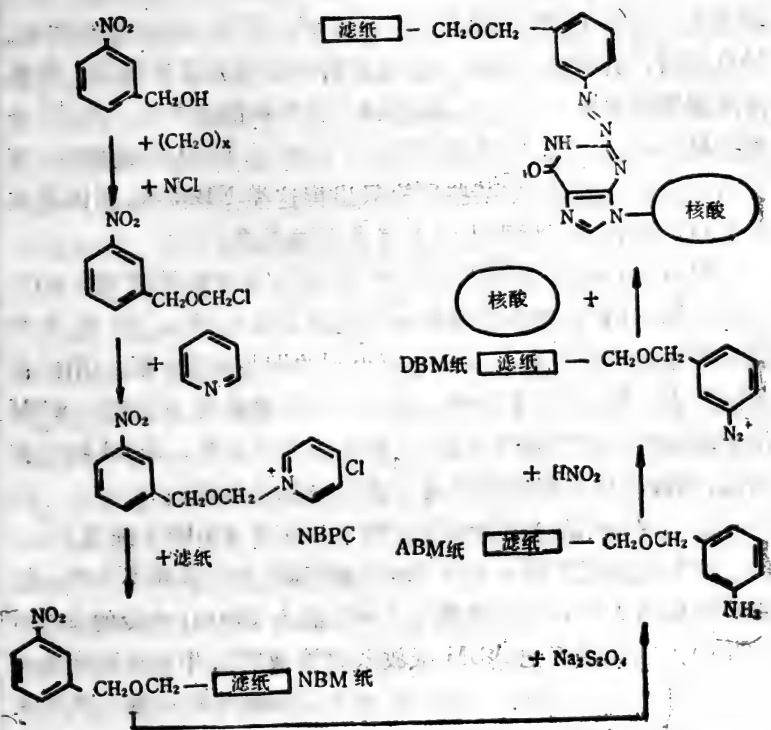
(1) 重氮化纸(Diazo paper) 又可分为重氮苄氧甲基纤维素纸(DBM 纸), 和重氮苯硫醚纤维素纸(Diazophenylthioether cellulose paper; 简称 DPT 纸)两种。由于重氮纸上的重氮基团非常活泼不稳定, 因此作为商品只能制成它们的非活化型中间体, 临用时由用户自己活化。例如 DBM 纸的商品, 或为硝基苄氧甲基纤维素纸(简称 NBM 纸, 如 Pierce 产品), 或为

氨基苄氧甲基纤维素纸(简称 ABM 纸)。DPT 纸亦然, 商品实为氨基苄硫醚纤维素纸(简称 APT 纸, 系 S & S Inc. 产品)。可见, 这些产品均未重氮化, 需要用户在临用时自己把它们重氮化。此外, 也由于重氮基团不稳定, 印渍中只能采用仅需较短时间的电印渍法, 不宜采用需长时间印渍的毛细作用法或扩散印渍法。

重氮化纸容易自制, 如下列反应式是 DBM 纸合成的全过程, 以及此产物(DBM 纸)经重氮化后印渍核酸时的共价键合反应(见最后反应式)。式中, 硝基苄氧甲基氯化吡啶(NBPO)、NBM 和 ABM 纸均有市售商品(如 British Drug Houses; Pierce Chemical Company; Schleiche & Schuell Inc. 等均有生产), 因此手头只要有任一种商品都可按下式合成到 DBM 纸。

具体操作是: 把干的氯化氢气通入含有 158g 多聚甲醛 [Paraformaldehyde; $(\text{CH}_2\text{O})_x$] 和 200g *m*-硝基苄乙醇 (*m*-Nitrobenzyl alcohol) 的 1L 苯溶液中, 室温下搅拌一夜。静置, 使有机相和水相分开, 除去上层有机相。水相中加入 150g 无水 Na_2SO_4 后过滤。装入旋转蒸发器中在减压下除苯, 然后在减压下蒸馏残留下的黄色溶液, 并收集压力达 1.5mm 汞柱、温度在 150°C 和 154°C 之间的分部。此步务要当心! 因为蒸馏近干燥时将可能爆炸。通常可以得到 216g 黄色液体, 把它慢慢加入到 750ml 搅拌着的、冰冷的吡啶溶液中, 静置一夜使吡啶盐结晶出来。用烧结玻璃漏斗收集结晶, 先用吡啶洗一次, 再用石油醚洗几次。在减压下干燥, 此即 NBPO。通常可得 267g NBPO, 产率为 73%, 把 NBPO 放入干燥器中贮于 -20°C 。

下面反应将在通风橱中进行, 以除吡啶雾气。用来反应的滤纸应有良好的机械强度和对化学试剂的抗性, 通常认为 Whatman 540 滤纸是合适的。反应可在长方形的搪瓷盘、玻璃



盘或不锈钢盘内进行,大小应和印渍模板相当或成倍数扩大,以便裁剪时不会浪费。首先把欲反应的滤纸裁成和上述瓷盘相同大小,放在瓷盘底部,并把瓷盘浮在 60°C 水浴上。按每平方厘米滤纸需用 $28.5\mu\text{l}$,内含 2.3mg NBPC ($8.14\mu\text{mol}$, $\text{MW}=280.7$) 和 0.7mg 三水醋酸钠的水溶液计算,准备好反应液。每次每盘只放一张滤纸与之反应。把反应液均匀地倒在纸上,用戴橡皮手套的手赶走纸面上气泡并不断而又均匀地用手晃动纸面溶液直到纸呈微干状态。把纸连盘放入 60°C 烘箱中干燥 10 分钟。

滤纸翻过来使纸背向上。调节烘箱,升温到 135°C ,并保温 30~40 分钟。这步很重要,如果温度达不到 135°C ,反应将不完全。经验证明,具有空气循环的烘箱能得到最好的反应效果。经烘烤的滤纸用水洗几次,共 20 分钟。再用丙酮洗 3 次,共 20 分钟。最后空气干燥,即得 NBM 纸。实际上,NBM 纸最稳定,可在冰箱中贮存数月,故某些厂家只出售这类 NBM 纸,原因就在于其稳定性好。其后则由用户完成下述步骤:

取 NBM 纸和 150ml 20% (w/v) 连二亚硫酸钠溶液, 60°C 下反应 30 分钟。反应在通风橱中进行以除去 SO_2 。反应期间需不时地摇动反应盘。反应结束得到的即是 ABM 纸。用大量水洗几次,每次 3~5 分钟,纸上千万不要留有 H_2S 味。ABM 纸也较稳定,可在真空下, 4°C 保存达 1 年之久。ABM 纸也有商品出售,用户在印渍时可按下述方法使之重氮化:

$14 \times 14\text{cm}$ 的 ABM 纸至少用 100ml 1.2M HCl 洗涤 1 次,然后把湿的滤纸直接放入 $0.3\text{ml}/\text{cm}^2$ 冰冷的 1.2M HCl 中。取新鲜配制的 1% NaNO_2 溶液 2.7 ml,混入 100ml 冰冷的 1.2M HCl 中,在冰浴下把 ABM 纸放入此溶液中,并不时地旋动一下。反应 30 分钟后取一滴溶液,加于淀粉碘化物试纸上测试亚硝酸,此时溶液应仍是阳性反应(黑色)。把这种已重氮化了的 ABM 纸(即 DBM 纸),仍保存在这种冰冷的酸溶液中,直到欲印渍的凝胶准备好时取出。用冰冷的水快速地洗两次,再用冰冷的印渍缓冲液洗两次,全部洗涤总时间不应超过 2~3 分钟。立即把 DBM 纸覆于凝胶上,装好印渍夹层进行电印渍,其间越快越好。

DBM 纸显然没有 NC 纸方便,又由于内部比较粗糙,印渍时常会降低凝胶原有的分辨率。但它能印渍 NC 纸不能印渍的 RNA 或 DNA 小片段^[53];它和生物大分子是共价连接,结合牢

固,印渍后的种种处理不会使生物分子脱落;它因此能在探针印盖中像录音带那样,在抹去探针后重复使用多次,这样就能顺次使用多种探针以便对同一印渍纸进行多种探测^[25]。

关于 DPT 纸,亦如上述 DBM 纸那样,市售商品系未活化的氨基苯硫醚纤维素纸(Aminophenylthioether cellulose paper;简称 APT 纸)。临用时由用户自己用酸性硝酸钠使 APT 纸重氮化。APT 纸也可自制,方法比 ABM 纸简便而安全,具体步骤如下:

取几张各为 14×25 cm 的 Whatman 50 滤纸,放入家用冰箱所用保鲜纸袋中。加入 70ml 含有 2mg/ml 氢硼化钠的 0.5M 氢氧化钠溶液,再加入 30 ml 1,4-丁二醇缩水二甘油醚(1,4-Butanediol diglycidyl ether)。把保鲜袋口用电烙铁加热封闭,在室温下把袋垂直旋转 16 小时。剪开袋口倒去液体,换加 10ml 2-氨基苯硫酚和 40ml 丙酮混合液,再把袋口熔封,又垂直旋转 10 小时。反应结束后剪开袋口倒去溶液。取出滤纸,顺次用丙酮洗两次、0.1N HCl 洗两次、 H_2O 洗几次、0.1N HCl 再洗两次。最后,用水洗几次后空气干燥即是 APT 纸。上述第一次水洗以前所有步骤,宜在通风橱中进行。空气干燥后的 APT 纸可贮于装有硅胶的干燥器中,放入 $4^\circ C$ 冰箱。通常认为,APT 纸比 ABM 纸更稳定^[54]。

APT 纸的重氮化步骤和前述 ABM 纸的活化步骤完全相同。Reiser 和 Wardale 曾用 DPT 纸成功地印渍过非洲绿猴肾细胞全细胞抽提液,以及猿猴病毒 40(SV 40) 外壳蛋白质^[54]。他们还比较了 DPT 纸及其前体的印渍效率^[54]。因为,Stellwag 和 Dahlberg 在使用 DBM 纸印渍 RNA、DNA 和蛋白质的实验中指出,即使重氮基团失活,DBM 纸还能以非共价方式结合部分 RNA 或 DNA^[55]。为此,Reiser 和 Wardale 也想证明 DPT

表 4-4 DPT 及其前体纸印渍蛋白质的效率与稳定性

纸 的 类 型	结合 ¹²⁵ I-IgG重链之%	
	未洗涤	经洗涤
I 新活化的 DPT 纸	100	70
II 印渍前用 0.1 M Tris-HCl (pH 9)-10% 乙醇胺-0.25% 白明胶处理 1 小时使重氮基失活的 DPT 纸	50	10
III APT 纸	75	15
IV whatman 50 滤纸	2	1
V whatman 540 滤纸	1	1

纸是否也有类似现象。于是他们把 ¹²⁵I 标记的羊 IgG 用 SDS-PAGE (7~20%) 进行分离, 然后用浸过印渍缓冲液 (10 mM pH 9.2 硼酸钠缓冲液) 5 分钟的 DPT 及其前体纸, 分别在 400 V (300~400 mA) 下电印渍 1 小时。印渍后, 经放射自显影定位, 切下各组 IgG 重链区带进行放射性计数。为了探究蛋白质和 DPT 及其前体纸结合的牢固程度, 各组印渍后各一分为二。一组用含 0.1 M 磷酸钠 (pH 7.5), 0.5 M NaCl 和 2% SDS 混合液, 在室温下洗 60 分钟后计数; 另组不洗, 结果如表 4-4。由表可见, 失活了的 DPT 纸确能非共价地结合蛋白质, 但其量仅为活化 DPT 纸的一半, 而且容易被洗掉 (80%)。未重氮化的 APT 纸也能非共价结合蛋白质, 且结合量高达 75%, 但它又会被含 SDS 的溶液洗去 80%。常规滤纸则不能和蛋白质结合。由上实验可知, DPT 纸能牢固地共价键合蛋白质, 虽经 SDS 去污剂洗涤仍能保留 70%。由于实验并未表明这洗去的 30% 是沾附的游离放射性 (若是, 则 70% 即是 DPT 纸实际的结合容量), 还是去污剂使共价键解离的部分 (似不可能), 还难以得出像他们所说的: “蛋白质有部分和 DPT 纸可逆结合” 这种结论^[54]。

(2) 溴化氰活化纸 生物大分子印渍术中被采用的另一种

化学活化纸是溴化氰活化纸(CNBr-activated paper; 简称CBA纸)^[56]。CBA纸也容易按Taylor改进的Clark等人的方法自制^[57], 具体步骤如下: 取20张直径为9cm的Whatman 40圆形滤纸, 放入1000ml烧杯中, 加入400ml, 0.1MNaHCO₃洗涤15分钟。洗涤时用手捧住烧杯作圆周式晃动, 切勿用玻棒去搅, 以免损伤滤纸(下同)。再换400ml水同样晃动下洗涤15分钟。以下步骤均在通风橱内进行。把洗过的20张滤纸放入2000ml装有CNBr溶液(12g CNBr+480ml H₂O)的烧杯中, 用2N NaOH调溶液酸碱度达pH11。此时活化反应开始, 用手捧住烧杯不时晃动, 又同时滴加2N NaOH使溶液恒定在pH11处。反应8分钟后倾去CNBr溶液使反应终止。留下的滤纸用500ml, 0.1MNaHCO₃洗, 共两次。然后按5张滤纸一组, 顺次用250ml, 0.1M NaHCO₃; 250mlH₂O; 200ml 50% 丙酮(用水配制)各洗1次。取出滤纸真空干燥, 放入装有干燥剂的干燥器中贮于4°C冰箱。这种经处理的CBA纸较稳定, 通常4°C下贮藏数月仍能保持活性。

Bhullar等人曾用CBA纸成功地印渍过抗T₂血清的特异性抗原^[56]。印渍时, 他们先把CBA纸用印渍缓冲液(pH6.5, 0.1M磷酸钠缓冲液)浸湿, 然后覆在凝胶(SDS-15%PAG)上, 用毛细作用印渍法印渍3小时。印渍后, CBA纸放入100ml猝灭缓冲液(0.1MTris, 1%甘氨酸、0.1%牛血浆白蛋白、10%乙醇胺), 于37°C下保温1小时, 以封阻CBA纸上那些未共价结合生物分子的剩余区域。然后再用抗血清、¹²⁵I-A蛋白先后处理而检出。他们认为CBA纸印渍蛋白质是很有效的, 被印渍区带虽经共价键合但还保持着抗原活性。

商品溴化氰是一种白色结晶, 室温下易挥发而产生有刺激性的剧毒蒸气。因而CBA纸制备时务必在良好的通风橱中进

行。反应后的 CNBr 废液不能随便丢弃，应与碱性硫酸亚铁相混合，使其破解为无毒而又易于随意处理的亚铁氰化物。

3. 尼龙衬底膜(Nylon-based membrane)及其它

尼龙衬底膜是一种俗称尼龙 66 的聚己二酰己二胺材料，经导入众多的叔胺基后被修饰成带阳电的膜。最初，这种膜材料被用于液体和气体的过滤。由于它具有如 NC 纸那样薄而光滑的表面，更大的机械强度，能和带阴离子的生物分子产生可逆的静电作用，以及具有结合蛋白质的高容量($480 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)而被应用于印渍术中。

尼龙衬底膜已有许多商品市售，最著名的商品名为 Zetabind，系 AMF Cuno Divison, Meriden, Conn. 的专利产品，因此印渍文献中常把尼龙衬底膜简称为 ZB 膜。其实，Bio-Rad Laboratories(Richmond, Calif.)生产的 Zetaprobe，以及 AMF/CUNO 生产的 Zetapor，均和 Zetabind 属于同种产品，它们的理化性质并无重大差异^[43]。因为这类商品名称均有 Zeta 字首，因此可以把 ZB 简称，看作是 Zeta 膜类(Zeta membranes)的缩写符号，而不是专指 Zetabind 商品^[52]。

ZB 膜商品可以直接用于印渍而无需任何加工。ZB 膜的高结合容量也造成产生高背景的危险，必须在印渍后做好猝灭其非特异性结合探针部位的步骤。ZB 膜印渍谱不能用常规的，用于凝胶的蛋白质染色剂染色，这是目前印渍术中人们力求解决的问题之一。在印渍术中 ZB 膜是仅次于 NC 纸而被广泛采用的印渍纸，曾成功地印渍过单链 DNA、双链 DNA^[57]，以及各种蛋白质^[58~60]。但是，Hossenlopp 等人近来试验了各种猝灭剂对 ZB 膜上蛋白质印渍谱背景高低的影响，包括 1% BSA、1% 白明胶、1% Polypep 和 1% 牛血红蛋白等^[60]。结果认为，不论用单种猝灭剂还是多种猝灭剂混合使用，ZB 膜的背景都较

高^[60]。用牛血红蛋白猝灭,背景虽有下降,但区带也不清晰^[60]。ZB膜尽管有许多优点,但若不解决这些问题必将限制它的进一步应用。

在印渍术中还有一些印渍用纸曾被报道过。例如, van den Berg 用离子交换纤维素纸——Whatman DE 81 成功地印渍了 2% 琼脂糖凝胶电泳分离的细菌胸苷激酶^[61]。他采用 50mM Tris-乙酸 (pH7.5), 0.5mM Mg-ATP, 1mM 巯基乙醇作为印渍缓冲液,并用毛细作用印渍法于 4°C 下印渍 1 夜,然后用 ¹²⁵I 标记脱氧胞苷作为探针而检出。van den Berg 指出,在这种条件下印渍后仍能保持酶活性。

前面讨论 NO 纸时提及,NO 纸中混有乙酸纤维素时结合容量下降^[48]。但是 Schaltman 和 Pongs 却用乙酸纤维素膜 (S & S CA 25010) 成功地从 SDS-10% PAG 上印渍了果蝇组织培养细胞质中蜕皮固醇可交联的蛋白质^[62]。

三、印渍缓冲液的选择

生物大分子印渍术发展至今仅十二年历史,有关印渍缓冲液的选择尚无可循规律。就目前已知印渍原理和大量实践经验,大致上可小结出如下原则: (1) 所选印渍缓冲液的组分和 pH, 应能使所需印渍的大分子具有最大溶解度,使之容易迁出凝胶而被印渍^[63]。(2) 所选缓冲液应能保持被印渍大分子仍具最大的分子亲和性,如像分子可杂交性、免疫活性或各类分子间的相互作用力等,以利于其后的专一性检出^[52]。(3) 所选印渍缓冲液应能防止产生高背景印渍谱。例如,采用重氮化纸的蛋白质印渍术中,若用 Tris-甘氨酸缓冲液时,甘氨酸也能和重氮基团反应,既降低了生物分子的印渍效率,又将其后用蛋白质

染料检出产生高背景^[13]。(4)所选印渍缓冲液应能防止凝胶在印渍中发生胀或缩等变形,为此人们常加抗变剂(如20%甲醇)于印渍缓冲液中^[48]。(5)采用电脱色槽类型的电印渍术,所选印渍缓冲液应有利于体系产生高电流,以便加快印渍速率。也就是说印渍缓冲液应是低离子强度的。

表4-5列出了印渍各种生物大分子曾采用过的各种印渍缓冲液及其它印渍条件。其中,蛋白质印渍术中最常采用的两种印渍缓冲液是: Towbin 等人提出的 pH 8.3, 25 mM Tris-192 mM 甘氨酸-20% 甲醇溶液^[48], 以及 Bittner 等人建立的 pH 5.5, 25 mM 磷酸钠缓冲液^[13]。它们常被称为标准印渍缓冲液。关于印渍缓冲液中添加甲醇、去污剂、有机溶剂等的利和害,已在印渍原理一章中阐述,这里不再重复。关于核酸印渍术,最常采用的印渍缓冲液是 Southern 建立的 SSC 缓冲液^[10], 系由 0.15 M NaCl-0.015 M 柠檬酸钠所组成。从表 4-5 不难看出,除少数例外,大多是上述三种印渍液的变体,而且只是在缓冲液组成的摩尔浓度上有所变化。当然,采用毛细作用或扩散作用印渍方式时,因不存在让印渍体系产生高电流的问题,所需缓冲液常常就是样品的电泳缓冲液,因此所用种类变化很大(见表 4-5)。

四、印渍步骤的操作要点

1. 印渍要点

印渍,虽说是印渍术中又一关键步骤,但其操作并不复杂。如果只想了解凝胶电泳分离的蛋白质混合物中存在多少区带,并用印渍纸把全谱长期保存下来,那么印渍是非常容易实现的。此时,只需把电泳后的凝胶放在玻璃板上,其上放一张 NO 纸,再放上三张普通干滤纸,压上一本书,任其在室温下放一夜。

表 4-5 印渍检出各种生物大分子所用印渍缓冲液及各种印渍条件

被印渍物质	印渍用模板(凝胶)	印渍方式	印渍纸	印渍缓冲液	猝灭剂	检出方式	文献
¹²⁵ I-蛋白质分子 量标准系列	SDS-12.5%PAGE	EB(30V, 0.5A, 1.5h)	NC; ZB	25mM Tris-192 mM甘氨酸(pH 8.3)-20%甲醇	—	IM	[11]
酵母线粒体细胞 色素 b ₀₁	SDS-11%PAGE	EB(60V, 2h)	NC	同上	8%BSA, 40°C, 30~60 min	IPA	[14]
E. coli 蛋白质合 成起始因子 (IF1, IF2, IF3)	SDS-10%PAGE	EB(20V, 300 mA, 6h)	NC	同上	3%BSA, 37°C, 1h	IPA	[15]
鼠脑突触体多肽	SDS-PGGE(7.5~ 15.0%)	EB(3V/cm, 21h)	NC	同上,但加0.1% SDS	5mg/ml BSA, 24h	IPA	[16]
蛙病毒 3(FV3) 蛋 白质; 中国仓鼠卵巢 细胞蛋白质; 以及 FV3 的 DNA 结合 蛋白质	SDS-12.5%PAGE	DB(36~ 48h); 双方向印渍	NC	0.05MNaCl, 2mM EDTA, 0.1mM DTT, 4M脲, 0.1 %SDS, 10m MT ris-HCl(pH7.0)	3%BSA-10% 37°C, 1h	ELISA; SP-DNA	[18]
人血清多聚免疫球 蛋白 IgA 和 IgM	SDS-脲-0.5%Ag- 2.1%PAGE	CB(3h) EB(1.5A, 2h)	NC	0.025 M 磷酸钠缓 冲液(pH7.2.)	3%BSA	ELISA	[19]
人红细胞膜的副流 感病毒受体	SDS-10%PAGE	EB(70~90 V, 5~6h)	NC	15.6mM Tris-120 mM甘氨酸(pH 8.3)-20%甲醇	3%BSA-1%胎 牛血清, 25°C, 2h	ELISA	[21]

(续表)

被印渍物质	印渍用模板(凝胶)	印渍方式	印渍纸	印渍缓冲液	显影剂	显影方法	文献
鼠肝细胞质膜糖蛋白 和血清类粘蛋白	SDS-PAGE	EB(400mA, 3~4h)	NC	25mM Tris-192 mM甘氨酸(pH 8.3)-0.1%SDS- 20%CH ₃ OH	2%PVP ₀ ,室 温,30min	¹²⁵ I-麦胚康集 素	[22]
流感嗜血杆菌表面 膜成分:脂多糖及表 面蛋白质	SDS-PAGE	EB(0.4A,2h)	NC	25mM Tris-192 mM甘氨酸	3%BSA-0.05% Tween 20	IPA;氨基黑 染色	[23]
人血清蛋白质	PAGIF(pH4~8)/ PGGE(4~17%)	EB(150mA, 10×10 min)	NC	0.25M Tris-0.19 M甘氨酸(pH8.3)	3%BSA, 室温, 2h	ELISA	[24]
多瘤病毒外壳蛋白质	0.9M乙酸-6.25M 脲-10%PAGE PAGIF(pH7~9)	EB	NC	24mM Tris-192 mM甘氨酸(pH 8.3)-20%甲醇	—	¹²⁵ I-直接标记 样品	[33]
鼠前脑钙调蛋白结合 蛋白质	8M脲-10%PAGE (双相,第二相酶 解)	EB(220mA, 16V, 16h)	NC; ZB	25mM Tris-192 mM甘氨酸(pH 8.2)-20%CH ₃ OH	Tween 20; 血红蛋白	¹²⁵ I-标记 Cal M	[38]
猴病毒 40(SV40)多 肽	SDS-15%PAGE	EB(70~250 mA, 10min~ 13h)	NC(各孔 径比较)	25mM Tris-190 mM甘氨酸(pH 8.3)-20%CH ₃ OH	0.25% 白明胶, 37°C, 1h	IPA	[40]

疟原虫感染红细胞的 疟疾抗原	SDS-7.5%PAGE	EB(6V/cm, 1h)	NC	40mM Tris-40mM 硼酸盐(pH8.3)- 20%CH ₃ OH	0.05% Tween 20	ELISA	[41]
肝细胞膜蛋白和兔 γ-球蛋白粗品	SDS-PGGE(3.4~ 20%)	EB(36~ 50V, 5~7h)	NC	50mM Tris-191 mM 甘氨酸(pH 8.3)-20% 乙醇或 甲醇	0.3% Tween 20	ELISA	[44]
鸡肝核糖体 60S 亚单 位蛋白质	脲或SDS-PAGE (双相)	EB(6V/cm, 1h)	NC	0.7% 乙酸; 或 25 mM Tris-192mM 甘氨酸(pH8.3)- 20% 甲醇	5% BSA, 1h, 40°C	IPA; 或/和 ELISA	[48]
抗 T2 血清特异性抗 原	SDS-15%PAGE	CB(室温, 3h)	CBA	0.1M 磷酸钠缓冲 液(pH6.5)	0.1% 牛血浆 白蛋白	IPA	[56]
血清胰岛素样生长因 子结合蛋白	SDS-12.5%PAGE; PGGE(10~17.5%)	EB(0.8A, 2h, 15°C)	NC; ZB	15mM Tris-120 mM 甘氨酸(pH 8.3)-5%CH ₃ OH	1% BSA, 2h	¹²⁵ I-标记 IGFs	[60]
SV 40 大 T 抗原	12.5%PAGE	DB(24~48h)	NC	10mM Tris-HCl (pH7.5)-50mM NaCl-2mM EDTA-0.1mM DTT	新生牛血清- 0.05% Triton X-100	¹²⁵ I-标记 P Ab ₄₂₃	[64]

(续表)

被印渍物质	印渍用模板(凝胶)	印渍方式	印渍纸	印渍缓冲液	猝灭剂	检出方式	参考文献
细菌 HB101 或 KY 893 株胸苷激酶	0.5%AgGE	CB(4°C, 1夜)	DE81	50mM Tris-乙酸 (pH7.5)-0.5mM Mg-ATP-1mM	—	¹²⁵ I-dU 或-dC	[61]
果蝇组织培养细胞可 交联脱皮固醇的蛋白 质	SDS-10%PAGE	CB(室温, 1 夜)	CA	0.14M NaCl-0.01 M KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (pH7.36)	—	³⁵ S-标记果蝇 蛋白质	[62]
HeLa 或小鸡细胞核 DNA 结合蛋白或 RNA 结合蛋白	0.1%SDS-4M脲- PAGE	DB(室温, 36 ~48h)	NC	0.05M NaCl-2 mM EDTA-0.1 mM DTT-10mM Tris-HCl(pH7.0)	邓氏试剂 (32°C, 1b)	³² P-DNA ¹²⁵ I-RNA	[65]
非洲绿猴肾细胞中能 结合SV40 的 VP ₁ 和 VP ₃ 蛋白质的蛋白质	SDS-12%PAGE; PAGE(7~20%)	EB(400V, 300~400mA, 10~20°C, 1h)	DPT	50mM 磷酸钠缓 冲液(pH9.2)	0.25% 白明胶, 20°C, 15min	IPA	[67]
小麦、黑麦和大麦等 谷粒抽提液中过敏原 蛋白质	PGGE(3~27%); SDS-8.4%PAGE	EB(36V/2.5 em, 60~90 min)	NO	0.7% 乙酸; 0.1% SDS-10mM Tris- 77mM 甘氨酸(pH 8.3)	0.05% 人血清 白蛋白-0.5% Tween 20, 室温, 16~24h	IPA	[66]

人血清 HBsAg	—	点印渍	CBA	10mM Tris-HCl (pH7.5)-50mM NaCl	小牛血清	¹²⁵ I-抗HBs	[68]
衣原体蛋白质	12.5%PAGE	EB(27V, 2A, 2h)	NC	50mM磷酸钠缓冲 液(pH7.5)	Tween 20, 37 °C, 1h	IPA	[69]
莫洛尼氏小鼠白血病 (MuLV) 感染 C3H 细胞的蛋白质	IF/SDS-PAGE PGGE(5~20%)	EB(6~8V/ cm, 16~22h)	NC	20mM Tris-150 mM 甘氨酸-20% CH ₃ OH	5%BSA V, 40°C, 30min	IPA	[70]
玉米花紋病毒 (MSpV) 和烟草花 叶病毒(TMV) 的外 壳蛋白质	SDS-12%PAGE	EB(10V/cm, 2h, 5V/cm, 1夜, 最后, 10 V/cm, 15min)	NC	同上	3% BSA-0.3% Tween 20		[71]
人红细胞膜上结合补 体 C ₃ 和 C _{3b} 的蛋白质	SDS-PAGE	EB(60mA, 200V, 4°C, 8h)	NC	0.005M Tris-甘 氨酸(pH8.3)	0.3% Tween 20, 37°C, 3×10 ³ min	过氧化物酶标	[72]
蛋白质高分子量标准 系列	PGGE(3.3~20%)	EB(200~400 mA, 60V)	NC	0.025M Tris- 0.19M 甘氨酸 (pH8.35)-20% 甲醇	0.3% Tween 20, 37°C, 40min	比较了各种染料 的全谱染色	[73]

(续表)

抗原或酶质	印渍用模板(凝胶)	印渍方式	印渍纸	印渍缓冲液	猝灭剂	检出方式	文献
肺炎球菌溶血素A原	SDS-PAGE	EB(1A, 1h)	NC	25mM Tris-192 mM 甘氨酸-20% CH ₃ OH	0.5% Tween 20, 室温, 30 min~3h	ELISA	[74]
革兰氏阴性菌外膜脂多糖	SDS-14% PAGE	EB(60 V, 3h)	NC	25mM Tris-150 mM 甘氨酸-20% CH ₃ OH	0.25% 白明胶, 40°C, 1h	IPA	[75]
猪肉中囊虫头节和囊壁蛋白质抗原; 中枢神经囊虫病检测	—	点印渍	CBA	0.5M 磷酸氢盐 (pH8.4)-0.1M 乙酸盐(pH4.5)- 0.1M 磷酸盐(pH 7.5)	0.3% 人血清白 蛋白	IPA	[76]
蛋白质高和低分子量标准系列	SDS-PAGE	EB(6~8V/ cm, 16~22h)	NC	20mM Tris-150 mM 甘氨酸 (pH 8.3)-20% 甲醇	0.5% Tween 20	ELISA	[77]
人红细胞膜嵌入膜蛋白	PGGE(8~25%)	EB	NC	同上	同上	ELISA	[78]

人胎盘 β -氨基己糖苷酶 A 和 B; 人脑包涵素	SDS-PAGE	EB(6V/cm, 1h)	NO	25mM Tris-192 mM 甘氨酸 (pH 8.3)-40%CH ₃ OH	3% BSA, 室温, 1 夜	ELISA	[79]
蛋白质高分子量标准系列	SDS-7.5%PAGE	EB(6~8V/cm, 16~22h)	NC	20mM Tris-192 mM 甘氨酸 (pH 8.3)-20%CH ₃ OH	0.3% Tween 20, 37°C, 45min	IM (各种染料全谱显色)	[80]
果蝇线粒体内、外膜蛋白质	SDS-13%PAGE	EB; DB	NC	50mM Tris-HCl (pH 7.4)-200mM NaCl	3% BSA-5% 羊血清, 15 min	IPA; ELISA	[81]
人红细胞表面复合糖类; 小鼠 EL ₄ 白血病细胞胎球蛋白	SDS-8%PAGE; SDS-10%PAGE	EB(5~45V, 2.5h)	NC	15.6mM Tris-120mM 甘氨酸 (pH 8.3)-20% 甲醇	3% BSA	荧光检出; ELISA	[82]
蛋白质分子量标准系列	SDS-12.5%PAGE	EB(80V, 2h; 或 30V, 1 夜)	NC	0.7% 乙酸; 25mM 乙酸胺/甘氨酸 (pH 9.5)-20% 甲醇等 各种缓冲液比较	—	IM (氨基黑 10B 染色谱)	[83]

被印渍物质	印渍用模板(凝胶)	印渍方式	印渍纸	印渍缓冲液	猝灭剂	检出方式	参考文献
小鸡肺上皮细胞总蛋白质	SDS-7.5%PAGE	EB	NC; ZB	25mM Tris-192 mM 甘氨酸(pH 8.3)	—	IM(铁染色)	[84]
小鼠浆细胞瘤 Adi PC5 细胞核的非组 蛋白染色蛋白质类 (NHcP)	4M 脲-SDS-PAGE; PAGE	EB(4~5.5V /cm, 1A, 室 温, 2h)	NC	25mM Tris-72 mM 甘氨酸(pH 8.8)	3% BSA-10% 羊血清, 37°C, 1h	ELISA	[85]
人胎盘胶原蛋白 I, III, IV 和 V 型	SDS-12.5%PAGE	BE(60V, 0.23 mA, 20 °C)	NC	25mM Tris-192 mM 甘氨酸(pH 8.3)-20%	Tween 20	ELISA	[86]
E. coli 谷酰胺酶和 玉米苗谷氨酸合成酶 活力测定	12% 淀粉凝胶	DE(室温, 1h, 负压下)	Dowex AG 1×8	25mM L-谷酰胺- 100mM 乙酸钠 (pH4.9)	—	酶-底物相互 作用	[87]
小鼠乳腺癌病毒 (MuMTV)的糖蛋白	4M 脲-9%PAGE	DE(双方向印 渍, 40~48h)	NC	10mM Tris-HCl- 50mM NaCl-2mM EDTA-0.1M DTT	—	¹²⁵ I-或 ³ H-标 记样品自显影	[88]
血浆抗胰蛋白酶 α ₁	SDS-9%PAGE	EB(50V/cm, 1h; 23°C)	NC	20mM Tris-150 mM 甘氨酸-20% CH ₃ OH	5% BSA-0.5% Tween 20, 30 min	ELISA	[89]

TMV 总蛋白质	SDS-10%PAGE	EB(6V/cm, 1h)	NC	同上, pH8.3	5% 山羊血清; 或0.05%Tween 20, 30min	金标记免疫检出	[90]
牛心线粒体内膜蛋白质	PGGE(3~20%)	EB(20V, 4°C, 4h)	NC	100mM Tris-甘氨酸 (pH9.0)	0.5%BSA	ELISA	[91]
猪胰匀浆物中蛋白酶类及其酶原活性测定	1%AgGE	CB(30min, 室温, 加压)	NC	直接印渍	—	酶-底物相互作用	[92]
自制生物素标记蛋白质分子量标准系列	SDS-10%PAGE	EB(1A, 1.5h)	NC	0.01%SDS-20mM Tris-150mM 甘氨酸-20%CH ₃ OH	3%BSA, 1h	ELISA	[93]
鼠肝核染色质组蛋白; 鼠肝细胞总蛋白质	SDS-PAGE	EB(400 mA, 8h, 40°C)	NC; ZB	25mM Tris-192 mM 甘氨酸 (pH 8.8)-20%CH ₃ OH 浆	10% BSA 分部 V-2.5% 人血	ELISA	[59]
肝素结合蛋白(脱脂蛋白 apo B, E 等)	6M 脲-0.1%SDS-PGGE(3~10%)	EB(0.2A, 4°C, 16~24h)	NC	0.1%SDS-25mM Tris-192mM 甘氨酸 (pH8.3)-20%CH ₃ OH	—	¹²⁵ I-标记肝素	[94]

被印渍物质	印渍用模板(凝胶)	印渍方式	印渍纸	印渍缓冲液	猝灭剂	检测方法	参考文献
兔肝胞色素 P-450 乙型同工酶	SDS-7.5% PAGE	EB(150mA, 16h)	NC	25mM Tris-192 mM 甘氨酸-20% CH ₃ OH	3% BSA, 40°C, 15min	ELISA	[95]
阿米巴溶酶体的二种 酶	SDS-7.5% PAGE; SDS-10% PAGE	EB(10V/cm, 冷, 1夜)	NC	20mM Tris-150 mM 甘氨酸-20% CH ₃ OH	0.3% BSA- 0.3% 牛血清,	ELISA	[96]
人小肠刷状边缘膜蔗 糖酶/异麦芽糖酶的 亚单位(S)和前体 (P)	SDS-7.5% PAGE	EB(6V/cm, 1h)	NC	25mM Tris-192 mM 甘氨酸(pH 8.3)-20%CH ₃ OH	0.5% BSA, 20°C, 1h	IPA	[97]
菠菜和豌豆叶抽提液 中淀粉酶的多态性	SDS-8.5% PAGE; PAGIF(pH3.5~ 10)	EB(350~ 470mA, 50V, 90min); DB	含淀粉酶 之凝胶	37.4mM Tris-288 mM 甘氨酸(pH 8.6)-50mM Mes- 5mM CaCl ₂	—	酶-底物相互 作用	[98]
鼠脑实触体膜蛋白	SDS-PGGE(5~ 20%)	EB(2h)	NC	20mM Tris-152 mM 甘氨酸(pH 8.4)-20%CH ₃ OH	0.05% Tween 20	ELISA	[99]
血吸虫可溶性尾蚴抗 原(SGA)	SDS-PGGE(3.3~ 20%)	EB(60V, 200 ~400mA); DB(16h)	NC	25mM Tris-193 mM 甘氨酸 (pH8.35)-20% CH ₃ OH	0.3% Tween 20, 40°C, 1h	ELISA	[100]

Novikoff 腹水肝细胞瘤染色质纤维蛋白原等	7.5%PAGE	EB(6V/cm, 1h)	NC	25mM Tris-192 mM 甘氨酸-20% CH ₃ OH	3% BSA-10% 牛血清, 40°C, 1h	ELISA	[101]
尿激酶等	SDS-11% PAGE	CB(37°C, 45min~2h)	NC	0.1M Tris-HCl (pH8.1)	—	¹²⁵ I-酪蛋白	[102]
粒病毒壳包蛋白质	SDS-15% PAGE	EB(5W, 4h)	NC	24mM Tris-192 mM 甘氨酸(pH 8.3)-20% 甲醇	4% BSA 分部 V, 摇 24h	IPA	[103]
入血浆中可粘连正常鼠肾细胞的蛋白质	SDS-7% PAGE	DB(36~48h)	NC	0.05MNaCl-2mMEDTA-0.1mM DTT-10mMTris-HCl(pH7.0)	5mg/mlBSA, 16h	细胞经染色后显微镜检查	[104]
牛血中的泛激素;含泛素 H2A 的组蛋白制剂	18% PAGE	EB(0.15A, 冰浴中, 3h)	NC	0.1% SDS-25mM Tris-190mM 甘氨酸(pH8.8)-20% CH ₃ OH	10% BSA-10% 热灭活了的FCS	IPA	[105]
小鼠 IgG 2a; 和癌胚抗原起交叉反应的抗原	SDS-10% PAGE	EB(10~11 V/cm, 5h)	NC	25mM Tris-192 mM 甘氨酸(pH 8.3)-20%CH ₃ OH	5%BSA, 40°C, 30min	生物素标记抗 CEA 单克隆抗体	[106]

被印渍物质	渍印用模板(凝胶)	印渍方式	印渍纸	印渍缓冲液	孵成剂	检出方式	文献
鸡肝细胞 80S, 60S, 40S 核糖体蛋白质	PAGIF/15% PAGE	EB(6V/cm, 1h)	NC	同上	5% BSA, 40°C, 1h	ELISA	[107]
DNA 聚合酶 III 的 β -亚单位	SDS-PGGE(7.5~17.5%)	EB(26V, 3h)	NC	同上	同上	ELISA	[108]
小鼠 3T3 成纤维细胞核糖体蛋白质	6M 脲-SDS-12% PAGE	EB(60V, 1h)	NC	14.4g/l 甘氨酸- g/Tris-20% CH ₃ OH	10% 马血清, 室温, 1h	ELISA	[109]
E. coli MRE600 株 DNA 的 Hae III 酶切片段; 核糖体 DNA 的 EcoRI 酶切片段	2% AgGE	CB(3~20h)	NC	SSC; 或 3MNaCl- 0.5MTris-HCl (pH7.0)	邓氏试剂, 65°C, 3~20h	18S; 28S 32P-RNA	[10]
脉胞菌核糖体的 RN; 质粒 pMF2 DNA 的 EcoRI 酶切片段	2.5% PAG+0.5% AgGE; 0.7~1% AgGE	EB(10V/cm, 4°C, 4~6h)	DBM	25mM 磷酸钠缓冲液 (pH5.5)	邓氏试剂, 37°C, 1h	32P-RNA	[55]
SV40 RNA; 以及仓鼠细胞聚(A ⁺)RNA	2% AgGE	OB(室温, 9.5h)	NC	25mM 磷酸钠缓冲液 (pH4.0)	邓氏试剂, 65°C, 1h	32P-DNA	[53]
32S 和 32P 标记的 DNA 的 Hind III 酶切片段	1% AgGE	CB(3~20h)	NC	0.15M NaCl -0.015M 柠檬酸钠	—	放射自显影全谱检出	[110]

λ噬菌体 cI ₈₅₇ 的 DNA 序列测定	0.8% AgGE	OB(3~20h)	NC	SSC	0.1% 牛血浆白 蛋白	生物素-11- dUTP 标 DNA	[45]
质粒 pRAF 87 DNA 的几种限制酶 切片段	1% AgGE	OB(3~20h)	NC	SSC	邓氏试剂, 65°C, 3~20h	¹²⁵ I-poly (A ⁺)RNA	[111]
烟草冠瘿肿瘤系 A652 DNA 的 EcoRI 酶切片段	1% AgGE	OB(3~20h)	NC; ZB	SSC	同上	³² P-RNA	[100]
入DNA的Hind III 酶解片段	1% AgGE	OB(室温, 20h; 或 80°C, 2h)	ZB	SSC	邓氏试剂	³² P-DNA	[39]
质粒 pBR 322 DNA 的 Hae III 酶解片 段	7% PAGE	EB(30V, 3h)	NC	50mM Tris-HCl- 50mM 磷酸盐 2mM EDTA(pH8.3)	—	³² P-DNA	[20]
脉胞菌 RNA; pMF2 质粒 DNA	2.5% PAG-0.5% AgGE; 0.7~1% AgGE	EB(10V/cm, 4~6h, 4°C)	DBM	25mM 磷酸钠缓冲 液 (pH5.5)	邓氏试剂	³² P-RNA	[55]

(续表)

被印渍物质	印渍用模板(凝胶)	印渍方式	印渍纸	印渍缓冲液	显色剂	检出方式	参考文献
模型多角体病毒DNA的各种限制酶切片段	0.5~1% AgGE	EB(室温, 1h)	DBM; NC	SSC; 1M 乙酸钠	邓氏试剂+100 μg/ml 变性DNA	³² P-RNA	[90]
酿酒酵母的TR14基因各种限制酶切片段	同上	同上	NC	同上	同上	³² P-Sal I cDNA	[112]
野生菌X2180-1A分离的poly(A ⁺) RNA	1.5% AgGE	CB(4°C, 12h)	NC	SSC	同上	³² P-cDNA	[112]
禾化小鼠的变性卫星DNA	—	点印渍	NC	SSC	0.2% 1mg/ml 邓氏试剂	禾化cDNA-ELISA	[79]
鸡红细胞样细胞系HI1组蛋白的BamHI, Sac I, NaeI 酶切片段	1.5% AgGE	CB	NC	SSC	邓氏试剂	³² P-cDNA	[59]
限制性内切酶BamHI消化的质粒DNA等	0.8% AgGE	CB	NC	SSC	邓氏试剂, 65°C, 3~20h	³² P-cDNA	[112]

缩写符号: PGGE, 聚丙烯酰胺浓度梯度凝胶; Ag, 琼脂糖凝胶; PAGIF, 聚丙烯酰胺凝胶电聚焦; AgGE, 琼脂糖凝胶电泳; EB, 电印渍; DB, 扩散法印渍; CB, 毛细作用印渍; NC, [硝酸纤维素纸; ZB, 尼龙衬底膜; CBA, 溴化氰活化纸; DE81, 离子交换纤维素纸; DPT 和 DBM, 重氮纸; DTT, 二巯苏糖醇; SSC, 0.15M NaCl-0.015M 柠檬酸钠缓冲液; BSA, 牛血清白蛋白; PVPO, 聚乙稀吡咯烷酮; 邓氏试剂, Denhardt 氏试剂, 即 0.02% PVPO(MW=360,000)-0.02% 聚蔗糖(Ficoll, MW=400,000)-0.02% BSA 溶液; IM, 直接检出法, 即样品已用放射性标记, 印渍后用放射自显影检出全谱, 或印渍谱用染料染色检出; IPA, ¹²⁵I-A 蛋白作为 J 抗检出的免疫检验法; ELISA, 酶联免疫检验法; CalM 酶联免疫检验法; CalM 酶联免疫检验法。

次日,取出 NC 纸浸入 0.1% 氨基黑-45% 甲醇-7% 乙酸溶液中染色 5 分钟,再放入 70% 甲醇-7% 乙酸中脱色 15 分钟,即可看到 NC 纸上,如凝胶中那样的蛋白质区带。如果长期保存,只需将染了色的 NC 纸用水漂洗后烘干(风干也行)即可。

当然,印渍术的重要目的在于感兴趣的某些分子特异性地定量检出,因此印渍操作就有一定要求。前已提及,印渍术中按印渍动力可分毛细作用力、扩散力和电动力三类;若按印渍方向分,则可分为单方向和双方向印渍两类;再按印渍方式,又可分为单拷贝和多拷贝两类。根据这些印渍类型,印渍操作要掌握三大要点。

首先,不论何种印渍类型,各印渍夹层(详见第三章)层间,尤其是凝胶和印渍纸之间,要绝对避免混有气泡。因为,气泡会产生高阻抗点从而形成低效印渍区(图 4-3)。这在印渍术语中称之为“秃斑(Bald spot)”。同样理由,各层间务要紧密、平整地贴在一起。

其次,不论何种类型印渍,需要控制好印渍时间(详见第二章印渍原理),尽可能使所需区带达到 95% 以上的印渍效率。这可以通过预备实验来取得经验。

第三,注意印渍纸放置方向。关于此项,则因不同印渍动力等而不同。对毛细作用印渍而言,印渍纸应放在液流穿过凝胶方向的前方。如图 3-1, 3-2, 3-3 所示,印渍缓冲液是靠顶部干滤纸吸引向上,故印渍纸理应放在凝胶的上面。就扩散印渍法而言,不论印渍夹层(图 3-5)是竖立,还是平卧于大容量印渍

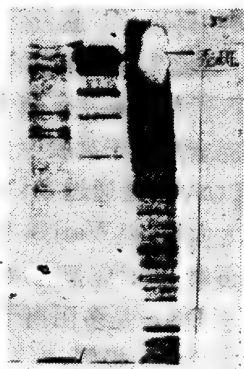


图 4-3 印渍夹层间混有气泡后形成的“秃斑”(箭头)

缓冲液中,因凝胶中区带会同时向两侧扩散,故印渍纸应在凝胶两侧各放一张,使之形成双方向印渍。印渍后总计两张印渍纸上相应区带的浓度才是真实的印渍效率。至于电印渍法,由于电流有方向性,更需注意印渍纸安放的位置。如果印渍模板是 SDS-PAG,那末 SDS-蛋白质复合物都带负电,必然全往阳极迁移,因此印渍纸应放在凝胶的阳极侧。常规凝胶分离的蛋白质群,或带正电,或带负电,或者净电荷为零。对这种印渍模板来说,需视所需分子在所选平衡缓冲液 pH 条件下显何电性而定。若现负电,印渍纸应放凝胶阳极侧;反之放阴极侧。如果需全谱检出,那末必须在凝胶的两侧各放一张印渍纸,进行双方向印渍,印渍结果将得到两张互补的印渍谱。此外,还要看印渍纸是何种材料。ZB 膜带众多的阳电荷,它能结合众多的阴离子大分子,因此采用 ZB 膜的电印渍,必须把它放在凝胶的阳极侧才有效。活化纸系共价结合大分子,本身就不存在方向性问题,此时完全取决于凝胶中分子所荷电性来决定把它放在凝胶的哪一侧。NC 纸是通过多种作用力与大分子结合的^[43],本身也应不存在方向性。但 Wallis 等人认为,NC 纸在 pH8.0 的印渍缓冲液中带负电,此时应把它放在凝胶的阴极侧^[113]。在 DNA 印渍术中,由于 DNA 是多阴离子生物大分子,电印渍时总是把印渍纸放在凝胶的阳极侧。

2. 多拷贝印渍

多拷贝印渍是印渍术不同于凝胶电泳技术的又一特点。也就是说,印渍术可像印刷那样利用一块印渍模板产生一个以上的复制品,所得每一拷贝又都能单独地用于分析和检验。这就使得原来只能用于一种目的之凝胶,可以通过印渍来用于多种目的。迄今,获得多拷贝的印渍方式除了双方向扩散印渍可得两张拷贝外^[18, 95],主要采用电印渍法。后者又可分为两种方式:

叠放式和印刷式。

(1) 叠放式多拷贝电印渍法 这是在凝胶一侧同时叠放数张印渍纸的电印渍方式,其夹层装配和常规电印渍夹层(如图3-8)并无两样。通常,一次印渍常叠放2~3张印渍纸^[14,15,40,66],但 Gershoni 和 Palade 曾一次印渍叠放10张^[14]。此时,他们把¹²⁵I 标记牛血清白蛋白(BSA)用 SDS-10% PAGE 分离,然后用它作模板,在其阳极侧叠放10张 NC 纸或 ZB 纸,并在30V 下电印渍1小时。印渍后分别测定各张印渍纸上 BSA 区带的放射性,结果如图4-4所示。可见,ZB 膜具有较高的结合容量,因此在第1、2张 ZB 膜上大量结合¹²⁵I-BSA 后,只有少量被结合于第3~8张 ZB 膜上。NC 纸结合容量虽然比较低,但是在叠放着的各层滤纸上都结合了一定量的¹²⁵I-BSA,其量几和印渍纸数呈平缓的直线下降。需要说明的是,欲印渍的拷贝数越多则凝胶电泳的上样量应越大。例如上述实验,¹²⁵I-BSA 的上样量高达1400ng^[14],这比常规上样200ng 左右要高7倍。上述实验也表明,这类多拷贝印渍采用 NC 纸比 ZB 膜好;所得10张拷贝 NC 纸上的印渍物浓度则随叠放纸号而递减。

(2) 印刷式多拷贝电印渍法 此法是在电印渍时,每隔一定时间换一张新的印渍纸,借此来获得多拷贝。例如, Svoboda 等人在研究印渍速率的时间进程(见图2-8)时,每隔15 min 换一张 NC 纸,共电印渍90min,故得6张印渍拷贝^[11]。Legocki 和 Verma 曾用图解(图4-5)来说明多拷贝电印渍谱免疫检出的实用性,并通过条件试验确定了多拷贝电印渍所需最佳印渍时间。他们把根瘤菌(*Rhizobium japonicum* 61A76 和 61A24 株)总蛋白抽提液,以200 μg 蛋白质浓度上样于双相凝胶,共分离出350~450条主要区带。用这种凝胶作模板,平衡后在其阳极侧放上一张 NC 纸,装配好夹层后浸入25mM Tris-192mM 甘

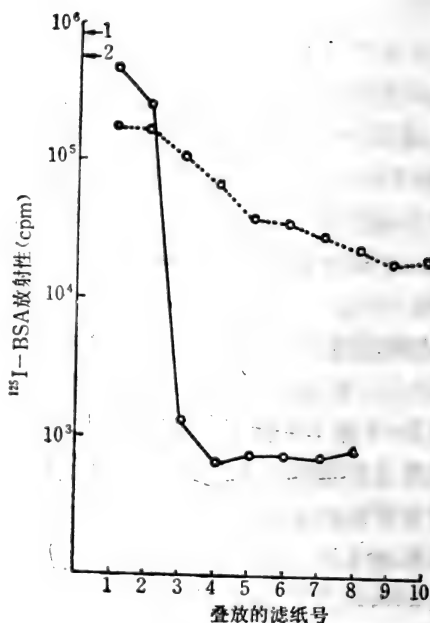


图 4-4 多拷贝电印渍所得 8 或 10 张 ZB 膜(●-●)或 NC 纸(○-○)拷贝上 ^{125}I -BSA 的放射性

箭头 1 指出 8 张 ZB 膜相加的总放射性量; 箭头 2 指 10 张 NC 纸相加的总放射性量。

氨酸(pH8.0)-20% 甲醇印渍缓冲液中, 300 mA 下电印渍 1 小时。取出夹层再换一张新的 NC 纸重复电印渍步骤, 如此操作共 3 次。所得各拷贝按图 4-5 安排, 其中一张经猝灭处理后用兔抗根瘤菌蛋白抗体保温, 再用 ^{125}I -A 蛋白显放射性谱^[12]。显然, 上述换 NC 纸的过程较为麻烦, 必须把紧固好的湿淋淋的夹层松开。为此, Manabe 等人专门为多拷贝电印渍设计了一种颇为合理的装置(见图 3-10)^[24]。它象油印机那样, 换纸时只需把夹层上半部提起即可。他们的装置可以同时放 4 块微型凝胶

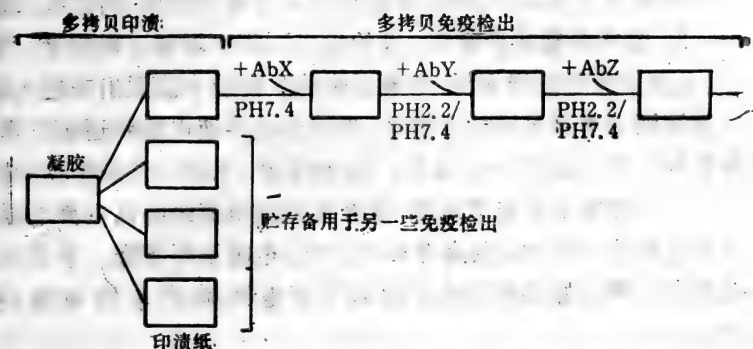


图 4-5 多拷贝电印渍在免疫检出中的应用示意图
AbX, AbY, AbZ 表示一张印渍纸上至少可用三种抗血清处理。

(详见第三章), 又由于电极之间距离仅是夹层的厚度, 故电印渍十分有效, 每 10 分钟即可换一张印渍纸, 共 50 分钟, 故可得 20 张拷贝^[24]。

3. 印渍电源

在第三章中已经论及, 电印渍槽实可分为电洗脱槽和电泳槽两类, 后者系 1983 年后才开始在一些实验室试制的自用装置。因此目前国内外市场上供应的电印渍槽都属电洗脱槽类。从原理上讲, 这类印渍槽都需要高电流、低电压的直流稳压电源, 如 5A, 100V。相反, 常规电泳仪的直流稳压电源则是低电流、高电压, 如 300~500mA, 500V。因此市售印渍槽(通常不附电源), 若用常规电泳仪电源替代, 操作时必须小心, 以防烧毁电流表。如所周知, 电洗脱是两电极同放于无分隔的同种溶液内, 这相当于把插在市电中的两根电线, 直接放入一盆冷水中使之加热的情景: 低电阻引起了高电流。其次, 电印渍最好采用铂片电极, 这样可使整块凝胶上任一点都具有相同的电场, 从而使任何区带能均匀地转移。然而即使很薄的、仅需 10×15cm 的铂片,

其价格都将是极其昂贵的,因此市售商品常用铂丝(两电极共需2m长)弯曲成栅状来替代,大的电极面积又增加了电流量。第三,正如电洗脱进程那样,电解质也将从凝胶中洗脱出来进入印渍缓冲液中增加溶液的导电性,也就是说溶液电阻将逐步下降,导致外电场电流进一步加大。由上可知,采用电洗脱槽作为印渍槽的电源应是高电流电源,最好采用恒电流式的高电流电源。否则在操作过程中,电流将不断上升,电阻不断下降。事实上,这类印渍槽最好采用高电流的12V充电器(如汽车用电瓶)来作为电源。

由上也可了解到,电印渍所用高电流必然使体系发热,这是电洗脱不可避免的现象,因此市售印渍槽商品大多附有冷却水循环装置。此外,印渍时间又取决于两电极间的距离。因为印渍速率又取决于电压梯度(V/cm),距离越远,电压梯度值越小。鉴于上述情况,我们在借用他人印渍经验时(表4-5),必须了解其印渍装置的情况,尤其是许多实验室系采用自制的电印渍槽,式样虽类同,但大小、电极距离等情况常有差异,而有关文献中又常常不具体说明。

总之,印渍术历史不长,现有印渍槽商品又存在着发热,价格昂贵,印渍时间长,耗电,不能多拷贝印渍等等弊端。可以预料,新一代类似于电泳槽式的印渍槽不久必会问世。

五、猝灭及猝灭剂选择

除了印渍样品已用放射性标记,或只想把印渍谱用常规染色法检出全谱外,凡印渍谱需用分子亲和技术特异性检出者,印渍后的印渍纸都要先经猝灭步骤才能用探针检出。正如在第二章中所讨论的,印渍后,印渍纸上未被大分子结合的区域必须封

阻。化学活化纸则需在印渍后使之失活。只有这样,才能在其后用探针印盖时,不会使探针(它们往往也是生物大分子)因被这些剩余活性或区域非特异结合而形成高背景。在实际操作中,猝灭步骤常不只是单纯为了封阻印渍纸上剩余作用力,也常伴有生物分子印渍后的复性等目的,尤其在免疫印渍时更是如此。例如 Petit 等人提出,从 SDS 变性凝胶上印渍而来的抗体,可在猝灭溶液中加入 Nonidet P-40 来促进抗体所具有的抗原特异性^[115]。Towbin 和 Gordon 也指出,有时只需简单地把猝灭反应时间,从原来的 1 小时增到 2 小时,同时提高反应温度到 40°C,就能改善印渍纸上核糖体蛋白质的检出信号^[52]。

猝灭剂的种类很多,大多仍是蛋白质,如牛血清白蛋白、血红蛋白、卵清蛋白、白明胶、各种动物全血清等。表 4-5 中已列出了各种生物分子印渍中所用猝灭剂,可作参考。

猝灭步骤的具体操作非常简单,通常只需把印渍好的印渍纸浸入由单种或数种猝灭剂组成的猝灭缓冲液中,于 25~60°C 下保温 1~12 小时即可。但是,正如原理一章所述,猝灭步骤既可用蛋白质类作为猝灭剂,也可用非蛋白质类,如像 Tween 20^[99]、聚乙烯吡咯烷酮(PVPO)^[22]和聚蔗糖(商品名 Ficoll)^[65]等。此外,猝灭时也可一步完成,也可分多步完成。例如 Hossenlopp 等人在印渍血清中类胰岛素生长因子的结合蛋白质时,猝灭步骤共分四步:先把印渍好的印渍纸经空气干燥;再用 3% NP40-TBS(0.9% NaCl-50mM NaH₂PO₄)于 4°C 下浸 30 分钟;然后换用 1% BSA-TBS 于 4°C 下浸 2 小时;最后改用 0.1% Tween 20-TBS 溶液浸 10 分钟^[60]。显然,第三步是猝灭的主要步骤,第四步被认为 Tween 有利于其后的印盖和防猝灭剂(BSA)脱落^[60]。鉴于猝灭缓冲液和猝灭条件的可变性,表 4-6 列举了 13 项较为典型的猝灭实例供参考。

表 4-6 常用猝灭缓冲液及猝灭条件

被印渍分子	猝灭缓冲液及猝灭条件	其后反应液中是否存在猝灭剂?	文献
麦粒抽提物中过敏原蛋白质	1%BSA-PBS(pH6.8)。或者: 0.05%BSA-0.5%Tween 20- PBS(pH7.4)	-	[66]
SV 40 特异性结合蛋白质	0.25% 白明胶-0.1MTris-HCl- 10% 乙醇胺(pH9.0); 20°C, 15min	-	[67]
酵母线粒体复合物 III	8%BSA-150mM NaCl-10mM NaH ₂ PO ₄ (pH7.2); 40°C, 30~ 60min	+	[14]
人血清蛋白质	3% BSA-0.9% NaCl-0.1% NaN ₃ -10mM Tris-HCl(pH7.4); 2h	+	[24]
血浆抗胰蛋白酶 α_1	(1) 5% BSA-PBS(100mM NaCl-38mMNa ₂ HPO ₄ - 12.5mMNaH ₂ PO ₄ -3mM NaN ₃ , pH7.4); 4°C (2) 0.5%T ween 20-PBS; 4°C, 30min	+(2)	[47]
E. Coli 溶胞物中蛋白质合成起始因子	(1) 3% BSA-0.9% NaCl-10mM Tris-HCl(pH7.4); 37°C, 1h (2) 0.5% BSA-0.5% Triton X- 100-0.2% SDS-0.01% NaN ₃ -0.9%NaCl; 洗 2 次	+(2)	[15]
染色质非组蛋白类蛋白质	3%BSA-10% 羊血清; 37°C, 1h	+	[85]
FV3 结构多肽	3%BSA-10% 胎牛血清-200mM NaCl-50mM Tris-HCl(pH7.0); 37°C, 1h	+	[18]

(续表)

被印渍分子	猝灭缓冲液及猝灭条件	其后反应液中是否存在猝灭剂?	文献
玉米花纹病毒和烟草花叶病毒 — 毒的壳包蛋白质	3%BSA-0.3%Tween 20-PBS (pH7.4); 15min	+	[116]
鼠脑突触体膜蛋白	0.05% Tween 20-PBS(pH7.2); 22°C, 3×5min	+	[99]
HeLa 细胞的 DNA 结合蛋白 (各种 DNA 印渍术也常用此猝灭剂)	0.02% PVPO-0.02% Ficoll- 0.02% BSA-1mM Na-EDTA- 10mM Tris-HCl(pH7.0); 15~ 30min	+	[65]
鼠肝细胞质膜糖蛋白和血清 类粘蛋白	2% PVPO-0.8% NaCl-0.02g KCl-0.015g Na ₂ HPO ₄ -0.02g KH ₂ PO ₄ (pH7.4); 30 min	+	[22]
血清中类胰岛素生长因子的 结合蛋白	(1) 印渍纸先经空气干燥 (2) 3%NP 40-TBS; 4°C, 30min (3) 1%BSA-TBS; 4°C, 2h (4) 0.1% Tween 20-TBS; 10min	+(4)	[60]

BSA, 牛血清白蛋白; PBS, 0.9%NaCl-50mM NaH₂PO₄; PVPO, 聚乙烯吡咯烷酮; TBS, 0.15MNaCl-0.01MTris-HCl(pH7.4)。-, 不存在; +, 存在; +(2), 存在第二种猝灭液。猝灭条件中未列反应温度者为室温。

目前认为, 使用非蛋白质类的 Tween 20 作为猝灭剂, 不仅有利于其后用蛋白质染料染出 NC 纸上全部蛋白质区带, 还有利于特异性免疫检出的免疫反应性^[60, 66, 99, 115]。Batteiger 等人曾对使用 Tween 20 作为猝灭剂作过详细的比较实验^[69], 他们用 12.5% PAGE 分离了沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis* L₂/434/Bu 株; 简称 LGV 434) 蛋白质, 然后电印渍于 NC 纸, 再按表 4-7 所列 12 组对同种 NC 印渍纸进行免疫检出。具体做法是:

表 4-7 Betteiger 等人在各猝灭剂比较实验中所用实验组合

NC 纸号	探针	猝灭剂	抗血清稀释液	洗涤液	注
1	PBS	PBS-TW	PBS-TW	PBS-TW	对照组
2	免疫前血清	PBS-TW	PBS-TW	PBS-TW	对照组
3	超免疫抗 LGV 343 兔血清	PBS-TW	PBS-TW	PBS-TW	
4		TSGAN-1% BSA	TSGAN	TSGAN	原 Cohen & Talkow 法 ^[117]
5		PBS-8%BSA	PBS-8%BSA	PBS-Triton X100	原 Vaessen et al 法 ^[14]
6		TS-3%BSA	TS-3%BSA	150mM NaCl	原 Towbin et al 法 ^[48]
7		TS-TW	TS-TW	150mM NaCl	
8		TS-3%BSA	TS-TW	150mM NaCl	
9		TSGA	TSGA	150mMNaCl	
10		TS-TW	TS-TW	TS-TW	
11		TSGA-TW	TSGA-TW	TSGA-TW	
12		PBS-TW	PBS-TW	PBS-S	原 Cohen & Talkow 法 ^[117]

PBS: 4mMKH₂PO₄, 16mMNa₂HPO₄, 115mM NaCl, pH7.3; TW: 0.05% Tween 20; TSGAN: 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.25%白明胶, 0.15% Na₂S, 0.1% Nonidet P-40, pH7.5; TS: 10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.4; TSGA: 同TSGAN, 但无 Nonidet P-40; S: 0.4% Sarkosyl.

(1) 各组按表 4-7 所列猝灭剂, 分别把 NO 纸于 37°C 下浸泡 1 小时。(2) 再分别换用超免疫抗 LGV 343 兔血清于 37°C 下反应 2 小时。所谓超免疫抗血清(Hyperimmune antiserum), 是指血清中含有极丰富的特异性抗体, 借此获得高检出率。此时, 1 和 2 试验组作为对照, 分别用 PBS 和免疫前的兔血清替代超免疫兔血清。此外, 各组超免疫兔血清分别用表 4-7 所列稀释液, 但稀释度均为 1:256。(3) 分别用表 4-7 所列洗涤液在室温下洗 15 分钟。(4) 用 ¹²⁵I-A 蛋白(比放射性 7μCi/μg)分别于

37°C 下保温 1 小时。(5) 分别用表 4-7 所列洗涤液洗 5 次, 共 30 分钟。在除去过量的 A 蛋白后把 NC 纸空气干燥, 最后用柯达 X-Qmat AR 底片于 -70°C 下放射自显影。结果如图 4-6 所示, 作为对照的 1 和 2 组, 看不到任何放射性区带。说明固定于 NC 纸上的衣原体蛋白质没有和 A 蛋白发生非特异性结合。也说明免疫前的兔血清中不含有 IgG, 或其它可以结合此抗原或 A 蛋白造成假阳性的血清因子(见图 4-6 之 2 号 NC 纸)。图 4-6 中, 第 3~12 号 NC 纸均是用超免疫兔血清检出的放射自显影谱, 其中第 5 号处理(表 4-7)实属 Vaessen 等人曾采用过的方法^[14], 洗涤液中含有非离子型去污剂 Triton X-100, 其结果比用其它去污剂的 NC 纸(第 3、4、7、8、10、11 号)所显区带

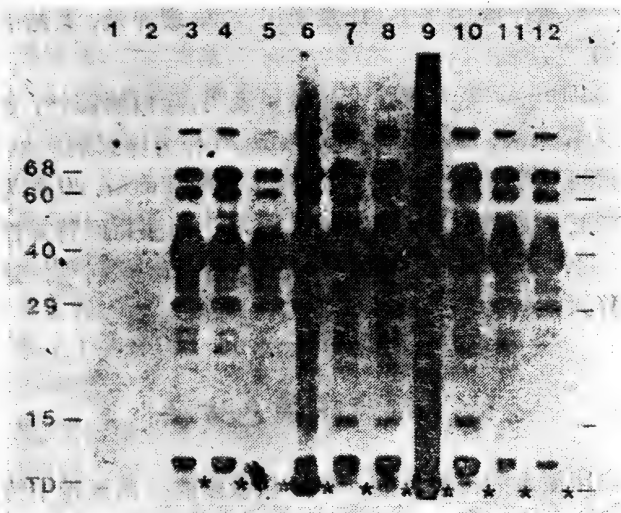


图 4-6 Batteiger 等人在各种猝灭剂的比较实验中所得到放射自显影谱

上部数字为 NC 纸试验号, 它们和表 4-7 所列相对应; 左侧数字为分子量(KD); TD 为指示染料。其它说明见正文。

数要少,区带强度也较弱。而且, Triton X-100 处理(第5号)和用 Nonidet P40(4号)或 Sarkosyl(12号)这两种去污剂处理的结果一样,都失去了一条和指示染料迁移率相同的小分子量区带(见图4-6)。这条区带用 Tween 20 作猝灭剂时可显现为弱区带(第3、7、8、10和11号),而在不用去污剂时则显现为强区带(第6和9号)。后来用氨基黑10B直接染这些用 PBS-Tween 20 猝灭过的 NC 纸,也没有看到这一区带有何增减,因而认为它可能不是多肽。从图4-6所显背景看,无论是用3% BSA(6号),还是用 Tween 20(3、7和10号),都能有效地猝灭 NC 纸上的未印渍区。相反,用白明胶作为猝灭剂时就难以猝灭了(9号)。此外,在使用 Tween 20 作为猝灭剂的处理中,无论使用磷酸缓冲液(3号),还是采用 Tris 缓冲液,其结果并无多大差别^[69]。

从 Batteiger 等人所得上述结果表明,除白明胶外,如果用 BSA 作为猝灭剂,其效果和用 Tween 20 作为猝灭剂的相当,都可以获得可以接受的背景值。但是,使用 Tween 20 作为猝灭剂时,因它不是蛋白质,故容许 NC 纸上印渍物经特异性免疫检出后,再用氨基黑 10B 对此 NC 纸进行全谱染色^[69],这是蛋白质类猝灭剂所做不到的。

六、印渍纸染色方法

虽说印渍术的主要目的,在于从众多的分离区带中特异性检出所需生物大分子。但随着本技术的发展,人们也希望能像凝胶染色那样,用常规染色法使印渍纸显现全谱。究其原因有四:(1)全谱的显现有利于欲检出分子的定位;(2)有利于用常规分子量标准系列来确定欲检出分子的分子量;(3)企图在常规染色

显现全谱后,就在此染色谱上再作特异性检出,起到“一箭双雕”的作用;(4)了解印渍后的区带数是否和原有凝胶中区带数相当,也即确定印渍的真实性。实践证明,印渍纸上蛋白质区带也可以用常规染料染色,而且染色和脱色总时间通常都只需数分钟。目前,有关印渍纸的全谱染色法大都集中于 NC 纸上蛋白质区带的显现,这固然是因为 NC 纸应用最广(见表 4-5),但也因为其它印渍纸的染色还存在一些问题。例如 ZB 膜带阳电,而大多数用于蛋白质的常规染料属阴离子,它们强烈地被 ZB 膜吸附而使之显高背景。此外,低浓度的去污剂,如 0.1% SDS、十二烷基三甲基溴化铵,或 Triton X-100 等,因能从 ZB 膜上除去染料而使蛋白质区带脱色^[14]。也曾试验过用阳离子染料来染 ZB 膜上印渍的蛋白质,其结果是既不能染 ZB 膜,也不能染其上之蛋白质^[14]。为此, Gershoni 和 Palade 提出了一种预处理 ZB 膜使之染色的方法^[14]:把印渍了蛋白质的 ZB 膜,先用 25% 异丙醇-10% 乙酸短时洗一下,再用大量水洗多次,把 ZB 膜放入 0.1% (w/v) 氯化铁水溶液中保温 0.5~1 分钟,经水洗后再放入 0.1% (w/v) 丹宁酸水溶液中保温,直到 ZB 膜上显现紫红色蛋白谱为止。此法总算使 ZB 膜染色获得成功,但染色强度通常较弱,方法尚需改善。

基于上述原因,本节将仅介绍有关 NC 纸上蛋白质区带的全谱染色法。

1. 常规蛋白质染料染色法

NC 纸上蛋白质印渍区带可用氨基黑 10B、考马斯亮蓝 R-250、快绿和印度墨水等染色而显现全谱。各种染色步骤示于表 4-8。其中,尤以氨基黑 10B 应用最多,各种配方仅在甲醇和乙酸浓度上略有变化。图 4-7 是 Towbin 等人用 NC 纸印渍分离 *E. coli* 核糖体总蛋白质的电泳凝胶时,采用考马斯亮蓝 R-

表 4-8 用常规染料显现 NC 纸上蛋白质区带全谱的操作步骤

染色步骤		脱色步骤		文献
染色液	染色时间	脱色液	脱色时间	
0.1% 氨基黑-45% 甲醇-10% 乙酸	3min	2%乙酸	15min	[49]
0.1% 氨基黑-45% 甲醇-7% 乙酸	5min	70%甲醇-7%乙酸	15min	[46]
0.1% 氨基黑-30% 甲醇-10% 乙酸	1h	60%甲醇-2%乙酸	短时洗几次	[23]
0.1% 氨基黑-25% 异丙醇-10% 乙酸	1min	25%异丙醇-10% 乙酸	20min	[74]
0.1% 考马斯亮蓝-50%甲醇-7%乙酸	5min	80%甲醇-9%乙酸	10min	[118]
0.2%考马斯亮蓝-30%甲醇-10%乙酸	10min	10%甲醇-10% 乙酸	15min	[102]
0.2%考马斯亮蓝-10%甲醇-14%乙酸	5min	10%甲醇-14% 乙酸	65°C, 1 夜	[46]
0.1% 快绿-45% 甲醇-7% 乙酸	5min	70%甲醇-7%乙酸	15min	[46]
0.1% 印度墨水(用 PBS-TW*配制)	摇 2h	无离子水浸泡	1 夜	[46]
0.1% 苯胺蓝黑-43% 甲醇-10% 丙 烯乙酸	15min	90%甲醇-2%乙酸	1h	[104]

* PBS-TW, 用 pH7.2, 0.01MNa₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液配制的 0.3% Tween 20 溶液。

250, 染并行实验所得又未印渍过的凝胶(A)和用氨基黑 10B 染印渍纸(B)所得到的结果^[48]。可见, 二者区带数相等, 且氨基黑染色后的背景并不比凝胶上的高^[48]。更重要的是, 凝胶的染色和脱色要费时数天; 相反, NC 纸上因区带已处在纸表面, 染色加脱色全过程仅需 20 分钟(过长的染色时间反而产生高背景)。Flanagan 和 Yost 也曾用实验证明, 经 Tween 20 浸泡过的 NC 印渍纸, 再用氨基黑染色时就不会产生高背景^[58]。但是, 大多数学者认为氨基黑、考马斯亮蓝、快绿和苯胺蓝黑的染色灵敏度不高^[43, 40, 50, 52, 114]。例如 Wojtkowiak 等人指出^[101], 用氨基黑染色, 当被染的蛋白质量少于 12.5 μ g 时就难染出。

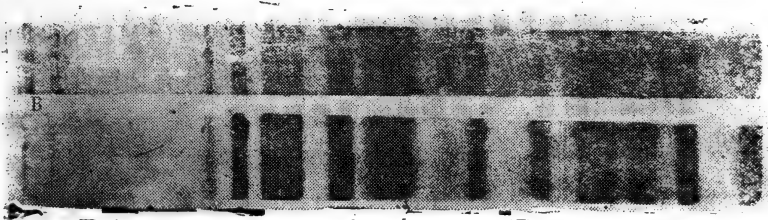


图 4-7 凝胶染色谱(A)和印渍纸染色谱(B)
的比较(说明见正文)

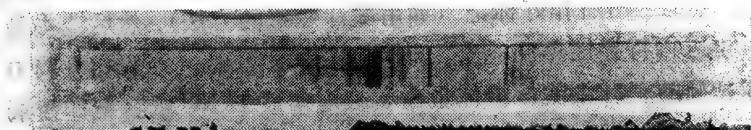


图 4-8 用印度墨水染 NC 纸印渍所得蛋白
质区带的染色谱(说明见正文)

表 4-8 所列染色剂中公认印度墨水(即墨汁)的灵敏度最高。Hancock 和 Tsang 曾对印度墨水染 NO 纸上蛋白质区带作过详细研究^[118], 认为印度墨水的最适浓度是 1ml PBS-TW 中含 $1\mu\text{l}$ 。低于此浓度就不能有效地染出蛋白质区带; 高于此浓度则引起高背景。他们又指出, 印度墨水染色液中含 Tween 20 时可以防止背景的增大, 其浓度在 0.05~5.0% 范围内都合适。染色时间最好为 2 小时, 若染一夜则更可取。染好色的 NO 纸能在 4°C 下至少保存一月。图 4-8 即是他们用 NO 纸印渍贾第鞭毛虫(*Giardia Lamblia*)全细胞 SDS 增溶分部所含蛋白质的印度墨水染色谱, 此时背景呈灰黄色, 区带显亮灰色, 即使少于 80ng 量的蛋白质都能检出。虽说印度墨水染色的灵敏度很高, 但不少学者指出此法具有高背景, 其灵敏度因蛋白质不同而不一样。例如 Falk 和 Elliott 证明^[116], 用印度墨水染大豆胰蛋白酶抑制剂和玉米去茎病毒(MstpV)的外壳蛋白质时效率极

差,而染蛋白质分子量标准系列和烟草花叶病毒(TMV)的外壳蛋白质时效果极好,从而指出用印度墨水染色具有选择性^[16]。

值得提出的是,全谱染色的重要目的之一在于特异性区带检出的定位。为此,一种实验常需做三套样品,即凝胶染色谱、印渍纸染色谱和未染印渍纸上特异性区带检出谱,这是比较不方便的。1982年 Towbin 等人设计出一种可逆染色法(Reversible staining method)^[107]。也就是说用染色剂显现 NC 纸上全谱后作好标记(如用墨汁刺点的方法),然后洗去染料再进行特异性免疫检出。他们的具体做法是,经双相凝胶电泳分离的鸡肝细胞核糖体蛋白质被电印渍于 NC 纸。把印渍纸用水短暂洗涤后浸入用 10mM 乙酸钠-乙酸(pH 5)缓冲液配制的,浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 的肝素溶液中共 3 次,每次 3 分钟。再把印渍纸浸泡于用同种缓冲液配制的,浓度为 200 $\mu\text{g/ml}$ 的甲苯胺蓝(Toluidene blue)染色液中染 3 次,每次 3 分钟。用水洗去过量的染料后,显现的蛋白质区带用墨汁作好标记,再把印渍纸浸入 50% CH_3OH -7.5% 乙酸中 1 小时。此时各蛋白质区带的染料被除去,NC 纸上的全谱消失,留下的只是墨汁标记点。此种印渍纸即可再用于特异性免疫检出,所显现的特异性区带很容易从印渍纸上的墨汁标记辨认出它是全谱中何条区带^[107]。

最近 Towbin 等人又创造了另两种可逆染色法。他们把印渍纸用 6M 脲和 50mg/L 酚红(用 1mM HCl 液配制)保温,再用 1mM HCl 液洗涤短时间。此时蛋白质区带被染成黄色,可在蓝色滤光片下清楚看到。或者,把此印渍纸空气干燥,再用氨蒸气熏,使蛋白质区带显红色。用墨汁作好标记后用生理盐水-磷酸缓冲液(PBS)洗去染料,再进行特异性免疫检出^[108]。

另一类具有同等效果的方法是全谱染色前先予特异性功能

检出的方法，这是由 Batteiger 等人创造的^[69]。他们在印渍后的所有步骤中，都加有 0.05% Tween 20(表 4-7)。它的存在，容许印渍纸在免疫检出后再用氨基黑 10B 显现全谱。有关此法的具体操作和原理已在前面猝灭一节中提及，这里不再重复。

2. 铁、银、金染色法

由于上述常用蛋白质染色剂的灵敏度较差，高灵敏度的印度墨水染色法又具高背景和选择性，因此人们一直在寻求印渍纸全谱染色的最佳方案。下述诸法即是近年来已报道过的全谱染色技术。

(1) 铁染料染色法 1986年 Moeremans 等人介绍了一种可在 ZB 膜和 NO 纸上染蛋白质区带的铁溶胶染色法^[84]。他们指出，带阳电的 ZB 膜若用于印渍 SDS-PAGE 时，因蛋白质均带负电，故有着比 NO 纸大得多的结合容量。但因蛋白质染料大多是阴离子，难以使阳性 ZB 膜上所结合的负性蛋白质染色，更何况阳性 ZB 膜会强烈结合阴离子染料而显高背景。但是，带负电的 SDS-蛋白质复合物和阳离子 ZB 膜结合后，该 SDS-蛋白质复合物剩余的负性可和阳离子的卡可基酸铁胶体(Cacodylate iron colloid)相结合，却又和 ZB 膜上未印渍区的阳离子相排斥。因此当用酸性亚铁氰化钾和卡可基酸铁发生显色反应时，就能达到 ZB 膜上低背景的蛋白质全谱显现^[84]。具体操作如下：

Tween 20-阳离子卡可基酸铁胶体染料(简称 Ferri Dye)的制备：取 10ml 0.5M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，在搅拌下逐滴加入到沸腾的 60ml 蒸馏水中。冷到室温，把溶液加到 9 体积 0.1M 卡可基钠(Sodium cacodylate)缓冲液(pH 7.0)中，测 460 nm 处溶液的光密度，并用卡可基钠缓冲液调到 $O.D_{460\text{nm}} = 0.5$ 。卡可基钠又名二甲胂酸钠，有毒，操作时要戴手套。加入 Tween 20

使其终浓度为 0.2%, 此即 Ferri Dye。

染色方法: 取印渍后的 ZB 膜用蒸馏水洗 3 次, 每次 10 分钟, 用量为 200ml。把 ZB 膜放入上述制备好的 Ferri Dye (3mm 宽的 ZB 膜用 5ml) 中, 室温下保温 1 小时(最好在带塞试管中进行, 操作时戴手套)。此时 ZB 膜上蛋白质区带显出淡的黄褐色, 几无背景或有轻微的背景(图 4-9A)。取出印渍膜, 用 200ml 蒸馏水洗 3×2 分钟, 加入新配的显色剂——酸性亚铁氰化钾溶液[若配 100 ml, 则为 40 ml 1 N HCl + 40 ml H_2O + 20ml 0.05M $K_4Fe(CN)_6$], 反应 1 分钟。此时蛋白质区带呈暗蓝色, 全谱反差极佳、背景很低(图 4-9B)。必须注意, 此反应会产生有毒的氰化氢气, 必须在良好的通风橱中进行。反应结束, ZB 膜用大量水冲洗, 然后干燥拍照。

Moeremans 等人认为, Ferri Dye 的浓度和染色背景有一定关系(见图 4-9)^[84]。他们试验了 $O.D_{460nm} = 0.05 \sim 1.50$ 的整个范围, 认为 $O.D_{460nm} = 0.4 \sim 0.6$ 范围内背景最低。此法也适用 NC 纸上蛋白质区带的染色, 灵敏度达 ng 水平。但他们也承认此法灵敏度比金染色低 8 倍。而且, 就 ZB 膜而言, 只适于染 SDS-PAG 作为印渍模板的、带负电的 SDS-蛋白质复合物, 或者染未用阳离子修饰过的尼龙膜上的印渍谱。

(2) 银染色技术(Silver-staining technique) 自从 1979 年 Swanstro 在凝胶电泳染色技术中引进银盐染色技术^[119]以来, 现已一致公认此法灵敏度要比常规考马斯亮蓝 R-250 高 100 倍^[120]。人们当然希望能把这种染色技术引入印渍纸的全谱染色中, Yuen 等人即是这样做的。他们试验了电泳分离后的蛋白质分子量标准系列, 被印渍于 NC 纸后的银盐染色效果^[103]。染色方法如下: 1) 印渍好的 NC 纸用 pH 7.4, 0.01M Tris-HCl 缓冲液浸 1 夜, 然后用无离子水洗两次, 每次 5 分钟;

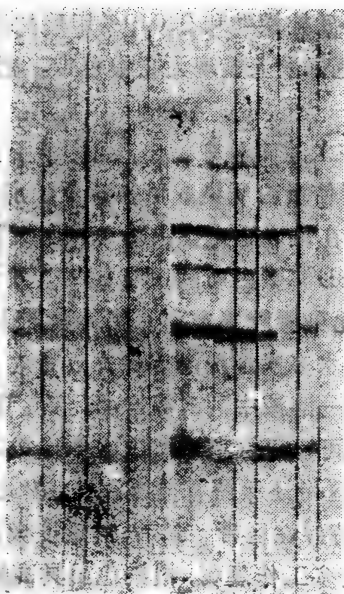


图 4-9 蛋白质分子量标准系列印渍于 ZB 膜的铁溶胶染色谱

A 为 FerriDye 染色谱; B 为 A 谱再用显色剂强化的显色谱。

A 和 B 组的 ZB 膜均切成 3mm 宽的 8 条, 并分别试验制备

FerriDye 时所取 $O. D_{460nm}$ 值。即自左向右 $O. D_{460nm}$

分别为 1.48、1.05、0.85、0.64、0.41、0.20、0.10, 和 0.05。

2) 把 NO 纸浸入 100ml, 0.5% 铁氰化钾溶液中, 在灯箱上摇动 5 分钟后换用无离子水短暂洗一下; 3) 把 NO 纸放入 100ml, 内含 0.2g 硝酸银和 0.2g 硝酸铵的水溶液中 (其中还含 0.5ml 37% 甲醛溶液), 在灯箱上摇 20 分钟; 4) 丢弃硝酸银溶液, 把 NO 纸在蒸馏水中浸两次, 每次 10 秒钟, 再用刚蒸馏的蒸馏水洗 3 分钟。把 NO 纸转入 100ml 内含 3% 碳酸钠和 0.25ml 37% 甲醛的溶液中摇 1 夜; 5) 用蒸馏水洗 NO 纸两次, 共 15 分钟。然后把它放入 100ml 内含 1.4ml NH_4OH 、0.07g NaOH 和 0.2g 硝酸银的溶液中反应 15 分钟, 接着用蒸馏水短暂洗两次; 6) 加入

100ml 内含 0.005% 柠檬酸和 0.019% 甲醛的溶液, 此时蛋白质将在较暗的黄褐色背景上显现为亮银色带。把 NC 染色纸马上放在水中贮存。

Yuen 等人在上述实验中指出, 当印渍不含 SDS 的蛋白质区带时, 银染料则使蛋白质染成可和背景区别的亮黄褐色。他们认为, SDS 的存在可以防止银在蛋白质上沉积, 因此用银染料染 NC 纸上印渍 SDS-蛋白质的区带最为有效^[103]。又指出, 用银染 NC 印渍纸比染凝胶更有利, 因为染 NC 纸时不需要像染凝胶那样, 用大量水多次地洗涤以除去过量的 SDS。其次, NC 纸染色时, 可在同一溶液中同时染数张, 这就节省了硝酸银。第三, 染好的 NC 纸可以无限期地贮于水中。第四, 用银染了色的 NC 纸上, 蛋白质区带还保留有抗原活性, 因此继染色后还能用免疫检出法检出特异性区带。最后, 灵敏度极高, 可染 ng 量的蛋白质。但是, 许多工作表明, 银染色虽具高的灵敏度, 但其背景较高, 所得染色谱常难以被接受^[49]。

(3) 金染色 (Gold staining) 1985 年, Moeremans 等人开创了用胶态金 (Colloidal gold) 染 NC 纸上蛋白质印渍区带的新方法^[80]。经和其它染色方法相比较, 认为金染色的灵敏度最高, 具有优良的对比度和低背景。他们采用 Bio-Rad 公司出品的蛋白质高分子量标准系列作为样品, 进行 SDS-7.5% PAGE 分离后, 电印渍于 NC 纸并用胶态金染色。具体操作如下:

胶态金溶胶的制备 (全部用重蒸馏水): 取 250 ml 0.01% HAuCl_4 溶液, 放入一架经仔细清洗过的、配有迴流冷凝管的锥形烧瓶中。搅拌, 并在沸腾下迴流。快速加入 7.5 ml 经 $0.2\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤的 1% 柠檬酸钠溶液。再迴流 30 分钟后让金溶胶液冷却, 并贮于无菌瓶中 (4°C)。实验证明, 胶态金颗粒大小和柠檬酸钠加量有关, 上述操作可得平均直径为 15nm 的金溶

胶。若制取 30 nm 或 45 nm 直径者,上述柠檬酸钠溶液分别改用 3.75 和 3ml 即可。

染色步骤: 印渍了的 NO 纸用大量含 0.3% Tween 20 的 PBS(pH7.2)溶液,于 37°C 下充分洗涤 30 分钟,然后再在室温下洗 3×15 分钟,以便彻底洗去凝胶上的杂质和残留的 SDS。NO 纸再用大量蒸馏水冲洗 3 分钟。取平均直径为 15~30nm 的金溶胶 75 ml,加入 5ml, 2% Tween 20 水溶液,充分混合后加入 20ml pH3 的 50mM 柠檬酸钠缓冲液。放入 NO 纸,于室温下保温 4 小时。通常,每平方厘米印渍纸约用此溶液 0.2ml 左右即可。由于背景仅因蛋白质样杂质存在而发生,故经充分洗涤过的 NO 纸,即使用金溶胶长时间染色也不会产生高背景。因此,为了使蛋白质区带和金溶胶完全结合,尤其是为了定量目的,上述反应时间至少 4 小时,越长越好。染色完成后,蛋白质区带显暗红色,空气干燥后可保存之。需要注意的是,若发现上述染色液在染色时转为蓝色就必须更换,这是印渍纸上有蛋白质被洗下与之反应的结果。

Moeremans 等人在此实验中,对各种染色剂的染色效果作了比较(图 4-10)。他们采用公认为灵敏度最高的银染料,对作为印渍模板的凝胶进行染色以资对照(图 4-10F)。由图可知,考马斯亮蓝、氨基黑和快绿的染色效果相似,但灵敏度都较差,每种蛋白质区带都需在 30ng 量时才能显色。印度墨水染色比较灵敏,各蛋白质区带量在 5ng 时即可染出。胶态金染色的灵敏度最高,约每区带在 3ng 时即可染出。由图也可知,Bio-Rad 公司出品的高分子量蛋白质标准系列虽标明由肌球蛋白(200 kDa)、磷酸化酶 b(92.5 kDa)、牛血清白蛋白(66.2 kDa)、卵清蛋白(43 kDa)等五种成分所组成,但用高灵敏度的金染料(包括印度墨水亦然)染色时,则显现出众多的杂

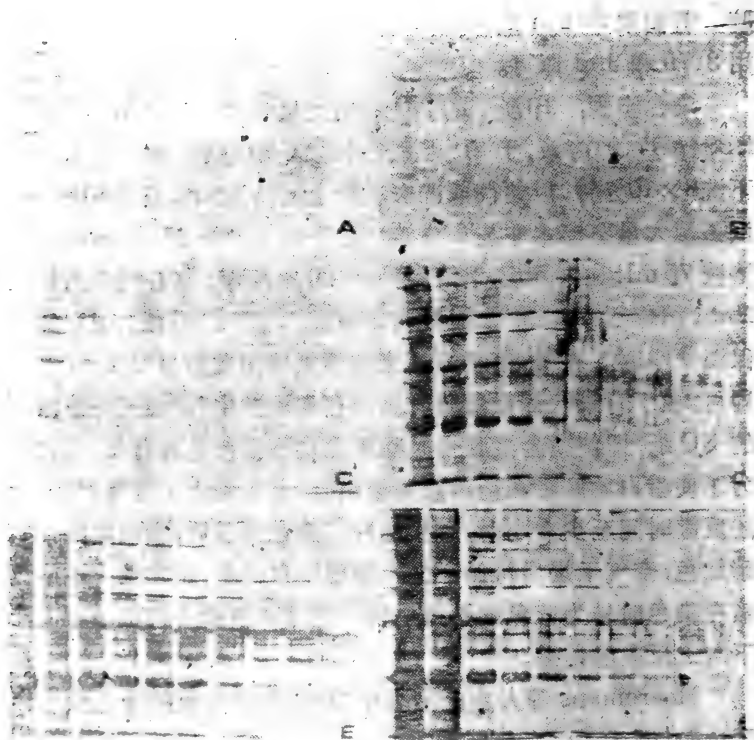


图 4-10 各种染色剂染 NC 纸印渍了的蛋白质分子量
标准系列所显染色谱比较

A. 考马斯亮蓝 R-250; B. 氨基黑 10B; C. 快绿; D. 印度墨水;
E. 金溶胶; F. 银染凝胶(对照)。各谱10条印渍纸区带浓度,自
左向右由 1000~3.5ng 递减。

蛋白区带^[30]。

Moeremans 等人也研究过金溶胶染色的最佳条件和染色机理,指出 pH3 时染色最强,高于 pH5 时染色强度弱许多,低于 pH1.2 效果也差,背景增强,故最适 pH 为 2~3。又指出金溶胶颗粒直径的影响较小,最佳在 15~30nm 颗粒直径范围内。

他们认为,金溶胶带负电,具疏水性,因此能和蛋白质上阳性基团和疏水基团很好结合^[80]。金染色操作简便、灵敏度高,值得重视。

七、印渍分子的特异性检出——印盖术

经猝灭处理的印渍纸或膜,其上被印渍分子可用探针特异性检出,这在印渍术中称为印盖(Overlay)。通常,在和探针反应的所有步骤中猝灭剂将始终存在,以便尽可能减少探针和印渍纸的非特异性结合。前已提及,这类特异性检出主要是依据生物分子间特有的亲和性,因此不同实验目的所用探针(或配体)分子截然不同。就当代印渍术而言,大多数工作集中在核酸和蛋白质这两大类物质。有关它们的特异性检出,前者常用分子杂交法,后者大多利用免疫反应性(见表4-5)。至于其它,例如脂多糖、酶与底物的相互作用等,虽说所用配体不同,但探测步骤大同小异,也无非是保温、洗涤等手法。为此本节将只讨论有代表性的核酸分子杂交法和蛋白质免疫印盖术。

1. 印渍纸上核酸分子杂交法

核酸印渍术中除常用放射性标记酶切片段,或用溴乙锭染色显现荧光全谱外,常采用放射性标记核酸作探针进行特异性检出,即用放射性标记单链核酸探针去寻找印渍纸上某种能与其碱基序列全部或部分配对的单链核酸,从而使之以放射性谱显现出来。这种用单链核酸探针去亲和结合另一单链核酸的方法俗称分子杂交(详见原理一章)。核酸印渍中常用的探针有:³²P-cDNA^[58]、³²P或³⁵S标记的用切口移位技术制备的DNA^[57, 121]、用末端标记法制备的³²P-RNA^[10]、连接着放射性氨基酸的tRNA、用³H或³²P进行活体内标记的RNA,以及

^{125}I 标记的 RNA^[65] 等。鉴于 DNA 或 RNA 在活体外进行放射性同位素标记的方法国内已有译著出版^[122]，这里不再重复。值得指出的是，八十年代始，出现了一类非放射性核酸探针和一类 RNA 探针(Riboprobe)——SP6 系统。前者将在第五章中专节讨论，关于后者，这里将作简单介绍。

以往人们在核酸分子杂交方法中，最常使用的是用切口移位技术制备的 DNA 探针，却较少使用 RNA 探针。原因在于长期以来找不到一个理想的系统，能方便地用来制备一定量标记的 RNA。不久前，随着新的 RNA 探针(SP6)系统载体和相应的 RNA 聚合酶的问世，已可在离体条件下，转录出一定量针对靶基因的 RNA 片段。研究表明，当噬菌体 SP6 感染鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)后，合成了一种由噬菌体编码的，对 SP6 噬菌体启动子具有高度特异性的 RNA 聚合酶。此酶是单条肽链，分子量 96,000，较易从感染细胞中纯化得到。纯化后的酶，在体外相当稳定，具很高活力。它催化转录作用，需 DNA 模板，以 Mg^{2+} 作辅助因子，容易被牛血清白蛋白及亚精胺激活。在离体条件下它仍能保持对 SP6 启动子的高度特异性，因此能把特异性载体(pSP₆₄ 和 pSP₆₅)中，紧插在 SP6 启动子下游的靶基因大量转录出来。SP6 转录产物的制备过程比较简单，如图 4-11 所示，先把靶基因插入特异性载体 pSP₆₄ 或 pSP₆₅ 的多联结子(polylinker)中。载体 pSP₆₄ 和 pSP₆₅ 的差异仅在于其多联结子的克隆位点顺序方向相反，即 pSP₆₄ 为 *Hind* III、*Pst* I、*Sal* I、*Acc* I、*Hinc* II、*Xba* I、*Bam* HI、*Ava* I、*Sma* I、*Sac* I、*Eco* RI；pSP₆₅ 正相反，即 *Eco* RI、*Sac* I、*Sma* I、*Ava* I、*Bam* HI、*Xba* I、*Hinc* II、*Acc* I、*Sac* II、*Pst* I、*Hind* III。用限制性内切酶把载体切成线型后作模板，在 SP6 RNA 聚合酶催化下可转录出均一的单链 RNA。通常以每 μg

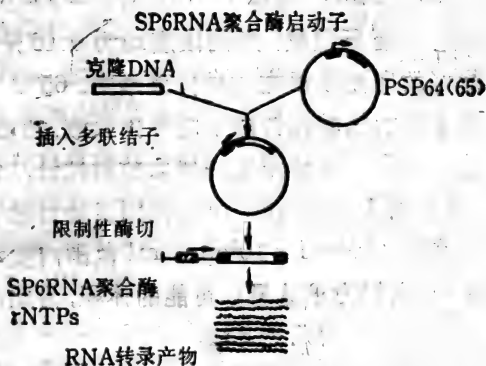


图4-11 SP6系统转录-RNA产物生产示意图

质粒DNA为模板，至少可转录得到 $10\mu\text{g}$ 以上的RNA。1984年以来，已有不少应用这种RNA探针在印渍纸上进行核酸分子杂交的报道。且认为，与有着类似大小和比活的DNA探针相比，这种RNA探针的灵敏度更高10倍。用此，RNA探针和印渍纸上RNA进行分子杂交时，经4小时曝光，即可检测出5pg(皮克)的RNA。甚至，0.5pg的珠蛋白mRNA，也可在48~72小时曝光后检出。

有关印渍纸上进行分子杂交的操作也很简单：印渍DNA后取下印渍纸，用圆珠笔在印渍纸上标上凝胶的位置和大小，放入SSC(0.15MNaCl-0.015M柠檬酸钠液，浓HCl调pH7.0)中漂洗后 80°C 下减压干燥2小时。经此处理的印渍纸，即使贮存数月仍可用于分子杂交，这是直接用凝胶来杂交所不能比拟的。如同蛋白质印渍那样，特异性检出核酸时，也需对印渍纸预先猝灭。在DNA印渍中常用Denhardt试剂作为猝灭剂^[123]，这是一种大分子混合物，系用 $3\times\text{SSC}$ 配制的，由商品名为Ficoll的聚蔗糖(MW=400,000)、聚乙烯吡咯烷酮

(Polyvinylpyrrolidone; 简称 PVPO; $MW = 330,000$) 和牛血清白蛋白 (BSA) 三者所组成, 所用浓度均为 0.02% (w/v)。猝灭时, 把干燥好的印渍纸浸在这种猝灭剂中, 65°C 下保温几小时。把事先制备好的核酸探针溶于同种猝灭液, 然后加入 SDS, 使其终浓度达 0.2% 。探针浓度一般以放射性计, 常规核酸分子杂交中, 一般采用 $1 \times 10^6 \text{cpm/ml}$, 但因实验目的和采用的方法不同^[124], 可在 $2 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5 \text{cpm/ml}$ 范围内变动。关于杂交溶液所用体积, 人们力求达最小可能的体积, 为此出现了对整张印渍纸进行分子杂交的几种方法:

(1) 把印渍纸卷扎在一根玻棒上, 然后插入直径与之相配的试管中, 此时只需加入能浸没印渍纸的体积即可。

(2) 把印渍纸卷起来插入试管, 使印渍纸紧贴在试管内壁呈单层(印渍面朝向试管中心), 加入适量杂交溶液后把试管密闭。把试管横放于一架专用滚筒器上, 此时杂交液刚好能以条状淹没一部分印渍纸。随着滚筒的旋转杂交液在印渍纸上运动, 不断浸湿整张纸并与之反应。当然, 如果没有滚筒器, 把试管横放于平板上用手来回推滚试管, 也能达同样效果。

(3) 把印渍纸放入聚乙烯袋(家用冰箱所用保鲜袋也可)或薄型塑料盒, 加入浸没印渍纸表面量的杂交液后, 用烙铁把袋口封住, 放入水浴中摇动使之反应。

(4) 把印渍纸用杂交溶液浸湿, 然后把它放入油中。或者把它贴在玻璃板上, 再用树胶粘贴纸把它粘封住。

在装置一章中所介绍的杂交狭槽(图 3-14)可归入第(3)类, 它比用保鲜袋更方便、更节省。所有上述方法, 其目的都在于用最小的体积去覆盖住整片印渍纸。但必须注意, 为了避免产生高背景, 印渍纸还是应该用足够量的反应液覆盖住, 千万别让印渍纸上有某些区域处于干燥状态, 或在杂交反应过程中干

燥。有些学者认为,杂交液中若有甲酰胺存在,将能得低背景。但此溶剂会降低杂交反应速率,又会使印渍纸上的DNA部分脱附而损失^[123]。另外,杂交反应液中存在空气时将引起高背景点,因此反应液在使用前需减压除气。汗水能引起探针的吸附作用,所以印渍纸别用赤裸的手指去操作。

杂交反应的时间取决于所用探针浓度和核酸序列的复杂性。目前核酸杂交反应大多在65~70°C间于2~6×SSC缓冲液中反应1~48小时。

在杂交反应之后,NC纸用大量稀盐溶液在高温下洗1小时以上。大多数实验室则采用大量0.1~2×SSC溶液,于60~70°C下洗1小时。充分洗涤有利于减低探针对印渍纸上非特异性结合区结合所形成的高背景;有利于减少探针对非同源核酸序列的结合。洗过的印渍纸被干燥后,即可用X射线胶片进行放射自显影。

印渍纸的放射自显影方法和通常在板形凝胶上所进行的方法并无两样。如所周知,胶片的感光乳剂不仅对光子敏感,而且对电离辐射也很敏感,因此能检出印渍纸或凝胶片上的³H、¹⁴O、³⁵S、³²P和¹²⁵I等。核酸分子杂交实验中人们常采用³²P来标记探针,因此常用间接放射自显影术来增强³²P或¹²⁵I的衰变敏感性。此时,常把印渍纸用两张塑料薄膜夹住(如果湿的印渍纸更需如此)。其一侧放一张X射线胶片(如Kodak XAR 5X胶片),胶片外侧再加一个由钨酸钙等制成的附有光源灯的增强屏(Intensification screen;如Dupont Cronex XG型增强屏)的暗盒。把此夹层两侧,用2mm厚的铝板夹住,放入-70°C冰箱中。打开增强屏暗盒所附15W灯泡(如Kodak GBX型安全灯泡),进行曝光4~18小时。夹层用铝板夹住的目的,在于防止冰箱内相邻放射自显影片的照射,而且也可使胶片和印渍

纸接触良好。由上可知,所谓间接放射自显影,只是在灯源和胶片间增加了一个增强屏。当它的一个晶体被光源电子冲击时,它能释放出许多光子,这些光子又使感光乳剂内的许多晶体敏感化,从而达到增强的目的。这样做常能使 ^{32}P 的检出灵敏度增大10倍左右;使 ^{125}I 的检出灵敏度约提高15~50倍^[123]。在上述操作中还需注意如下事项:

(1) 印渍纸,尤其是采用湿的印渍纸,在用塑料薄膜夹住时,层间要避免气泡。否则,所得放射自显影谱上将出现如眼角旁皱纹那样的图形。因此操作时,常把湿的印渍纸平铺在一块塑料薄膜上,其上放一张滤纸,然后再放上一块塑料薄膜。用手按压推平,以减少层间气泡产生。

(2) 增强屏也能产生磷光,在组装夹层时不能使它见光。

(3) 为了增强微弱区带的敏感度,可以使胶片预闪光(Preflash)。这可在放射自显影前,用一张放大相纸曝光胶片来实现。最好的预曝光能凭经验测定,而且显影胶片的光密度(OD)值约为0.1到0.2之间。测定OD值时,只需将显影的胶片放在分光光度计中于660 nm波长下测定即可。

(4) 所得放射自显影谱可用密度计进行全谱定量扫描。或者,按此谱定出另张同种印渍纸拷贝的区带位置,剪下区带用 γ 计数器计数定量。

(5) 对 ^3H 标记的杂交分子的检出而言,印渍纸应浸入用甲苯配制的20%2,5-二苯噁唑(PPO)溶液中,使其被PPO饱和。然后平放,让溶剂充分蒸发掉。像这样被有机溶剂顶替去水的印渍纸,就可进行放射自显影了。

2. 印渍纸上蛋白质分子的免疫检出方法

免疫检出法是近代印渍术中特异性检出蛋白质分子最常用的方法。在免疫检出中又以间接法应用最广(详见第二章),为

此常用双抗体。所用探针,或用荧光素标记、或用同位素或酶标记。目前,后两种标记应用最广,且已有成套试剂市售。免疫检出(印渍术中称为免疫印盖)具有高灵敏度,常能检出细胞或体液中 $1\text{pg}\sim 1\text{ng}$ 量的病毒抗原。印盖期间所用抗体稀释度和反应条件变化很大,取决于印渍纸上抗原量和所用抗体性质。对高亲合力(Avidity)^[125]抗体而言,可以采用高稀释度和长时间保温,以便节约昂贵的抗血清(如抗激素血清价格极高)。相反,对半寿期仅3小时的低亲合力抗体而言,最好使用高抗体浓度和短时间的反应条件,因为较长的反应时间将导致抗体溶解。Towbin 和 Gordon 曾用高亲合性的单克隆抗体进行实验并计算,认为应用 10^{-9}M (对 IgG 类而言约等于 $0.15\mu\text{g}/\text{ml}$) 的抗体浓度,印盖1小时左右,通常就能有效地检出^[52]。他们认为,在间接法检出中,结合于抗原的 I 抗,常在免疫固定过程中因采用了 II 抗而使之稳定下来^[52]。

放射免疫印盖中,最常采用 ^{125}I 标记的葡萄球菌 A 蛋白作为探针。此时,不可用全血清作为印渍纸的猝灭剂,以防血清成分和 A 蛋白结合造成假象。A 蛋白的结合因种属和同型物(即由同一种属产生的二或多种抗体之一)的现象而有很大差异^[126]。现在认为,兔抗体和 A 蛋白结合最好^[52]。

酶联免疫印盖中,最广泛使用的是辣根过氧化物酶(PO)和碱性磷酸酶,前者尤广。实际上这些方法都来源于免疫组织化学的酶标技术。通常,采用偶联着 PO 的兔抗免疫球蛋白试剂,检出的限度约在 0.1ng 到 1fmol (飞摩尔, 10^{-15}g) 免疫球蛋白范围内。但用它检出印渍纸上抗原时,此法是否能达到这种灵敏度,则取决于抗原复性的程度、能否抑制住背景,以及免疫试剂的保温时间、亲合性和有效浓度^[52]。

近年来还报道过许多新的免疫印盖技术,如 Howe 和

Hershey的免疫金试剂(Immunogold reagent)^[15], 以及Brower等人的链霉抗生素-酸性磷酸酶复合物^[89]等。鉴于免疫印盖条件的可变性, 本节将举实例说明各种探针免疫检出的具体操作。有关各种抗原所用免疫检出方法, 可查表4-5。

(1) ^{125}I -A蛋白的免疫检出法 这里举Loeb免疫检出流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)外膜蛋白质为例^[23], 具体操作如下: 经分离的外膜制剂用SDS-PAGE分离, 然后电印渍于NC纸。因本实验目的在于了解各种变株缺何种外膜蛋白质, 因此用各种变株全细胞悬液分别注射白兔, 所得抗血清分别和印渍纸上的外膜成份进行免疫印盖。为了试验多种变株, 把一张印渍好的NC纸, 剪成宽0.5cm的窄条, 以便每条能用一种抗血清印盖。印盖前, NC条用10ml, 内含3%BSA, 0.0015M叠氮化钠和0.05%Tween 80的PBS缓冲液。室温下摇(60r/min)90分钟, 以猝灭NC条未印渍部位。然后直接加入稀释度为1:100的抗血清再摇90分钟。反应毕, 取出NC纸条, 用40mlPBS洗 2×15 分钟, 再用含0.05% Tween 80的PBS洗 2×15 分钟。把NC纸条放入10ml内含 $0.3\mu\text{Ci } ^{125}\text{I}$ -A蛋白(New England Nuclear产品, 比放射性为70~100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)的上述同种猝灭缓冲液中, 再在室温下摇90分钟。反应毕, NC纸如抗体反应后的洗涤步骤那样清洗。把NC条取出滴干水, 夹在两块塑料薄膜之间, 用手按压除去过分的潮气。此夹层上放上一张Kodak X-Omat AR胶片, 并在附有增强屏的暗盒中曝光。所得放射自显影底片用LKB 2202 Ultro Scan激光密度计扫描定量。

(2) 荧光素标记免疫检出法 Towbin等人^[48]在用印渍术免疫检出*E. coli*核糖体L7和L12蛋白时, 采用了荧光素标记探针作为II抗。他们首先用羧甲基纤维素和DEAE-纤

纤维素柱从 *E. coli* 核糖体 50s 亚单位中提纯了 L7 和 L12 蛋白, 然后用弗氏完全佐剂(Freund complete adjuvant)乳化, 以 250 μ g 蛋白质量皮下注射于山羊几个部位以引起抗体。其后于第 38、79 和 110 天再次注射。最后在第 117 天对动物放血, 所得抗血清(抗-L7/L12 血清)作为 I 抗。*E. coli* 核糖体蛋白质用含 8M 脲-18%PAGE 进行分离, 电印渍于 NC 纸(电压梯度 6V/cm; 1 小时)。印渍纸用内含 3%BSA 的 0.9% NaCl-10 mM Tris-HCl(pH7.4)缓冲液于 40 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时, 以便猝灭印渍纸上剩余结合部位。再把 NC 纸转入用上述同种猝灭缓冲液以 1:10 稀释的抗 L7/L12 血清(每毫升滴度为 340 pmol)溶液中(即 I 抗液), 室温下保温 2 小时。反应结束后用猝灭缓冲液洗 5 次, 共 30 分钟。把 NC 纸转入偶联有荧光素的兔抗-山羊 IgG(Nordic Laboratories, Tilburg, Netherlands 产品)液中。此溶液用上述猝灭缓冲液配制, 稀释度为 1:50, 且内含 10% 兔血清。此 II 抗反应在室温下进行 30 分钟后用大量猝灭缓冲液洗 5 次, 共 30 分钟。经上述处理后得到的印渍纸, 即可在加有黄色滤光片的, 长波长紫外灯上看到荧光谱(图 4-12B)。

(3) 辣根过氧化物酶联免疫检出法 Towbin 等人^[48]在用上述材料进行荧光素免疫检出的同时, 又用辣根过氧化物酶联兔抗-山羊 IgG(来自上述同一厂家的商品)作了比较实验。由于 Towbin 等人的工作较早进行(1979年), 被视为当代印渍术免疫检出的经典方法。以后的许多工作常沿用此法或在此基础上稍加修改^[95], 故值得重视。Towbin 等人酶联免疫检出的 I 抗反应步骤和上述荧光法相同。即在 I 抗反应并用猝灭液洗涤 5 次后, 把 NC 纸转入用猝灭缓冲液稀释为 1:2000 的辣根过氧化物酶联兔抗-山羊 IgG、内含 10% 兔血清的溶液中, 在室温下保温 2 小时。反应结束, 用猝灭液洗 5 次, 共 30 分钟。把 NC 纸浸入

内含 $25\mu\text{g/ml}$ 邻联苯茴香胺(O-dianisidine)和 0.01% H_2O_2 的 10mM , $\text{pH}7.4$ Tris-HCl 缓冲液中, 室温下反应 $20\sim 30$ 分钟后, NC 纸用水洗来终止反应。此底物显色混合液必须用时新配, 可采用 1% 邻联茴香胺甲醇溶液和 0.3% H_2O_2 作为贮备液来配制。用水洗过的 NC 纸可夹在两张普通滤纸间使之干燥。干燥后的 NC 纸, 其背景颜色有颇大下降, 可避光保存之。

图 4-12 系 Towbin 等人用酶联(A)和荧光素偶联(B), 免疫检出 *E. coli* 核糖体 L7 和 L12 蛋白的特异性检出谱。因 L7 和 L12 蛋白仅在氨基末端处有些差异, 二者电泳迁移率极相近。从图 4-12 可见, NC 上只显 L7 和 L12 两条区带(荧光谱上的椭圆形斑点是污染物)。其实前面所列图 4-7 即是本实验的对照谱, 可以看出核糖体总蛋白具有众多的成分, 经特异性免疫检出后其它区带就不能显现, 这充分证明免疫检出法的高度特异性。由图 4-9 也可看出, 酶联免疫检出的灵敏度高于荧光法。前者, 两种蛋白区带仍相混, 说明还可进一步降低所用 $1:2000$ 这一稀释度(荧光素偶联剂所用稀释度为 $1:50$)。此外, 当代印渍术中人们喜欢采用酶联免疫检出法还有如下原因: 一是避免放射性污染; 二是灵敏度颇高; 三是直接看到区带显色;



图 4-12 酶联(A)和荧光素偶联(B)免疫检出 *E. coli* 核糖体 L7 和 L12 蛋白的比较

四是利于保存。

有关过氧化物酶联免疫检出的显色剂,在印渍术中应用的已有许多,如邻苯二胺(O-Phenylenediamine)和4-氯-1-萘酚(4-Chloro-1-naphthol)^[86]、正苯二胺(Orthophenylenediamine)^[74]、3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-Diaminobenzidine)^[49]、邻联苯茴香胺(O-Dianisidine)^[44]、二氨基联苯胺四氢氯化物(3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride)^[99]等。有关过氧化物酶联抗体也有许多种,且大多为市售商品。例如已用于印渍术的有偶联着A蛋白的辣根过氧化物酶抗体^[71]、偶联抗生物素蛋白(Avidin)的辣根过氧化物酶抗体^[59]、过氧化物酶-抗过氧化物酶复合物^[49]等等。种类虽多,但具体操作步骤也不过和上述实例大同小异。

(4) 碱性磷酸酶联免疫检出法 此法首先由Blake等人引入印渍术的特异性免疫检出中^[74]。此法原是O'Connor和Ashman为检出组织切片上微量碱性磷酸酶而创立的组织化学分析法^[127],但原法中使用了3-羟基-2-萘酸-2,4-二甲基酰替苯胺磷酸作为底物。由于它在水溶液中不稳定,Blake等人在引入印渍术时,改用了5-溴-4-氯吲哚磷酸(5-Bromo-4-Chloroindoxyl phosphate,简称BCP)^[74]。由于他们的目的在于检出淋球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)外膜蛋白中的I蛋白,为此他们用提纯了的I蛋白作免疫原,以100 μ g/ml I蛋白的浓度和弗氏完全佐剂等体积混合,然后注射入白兔的肩胛下。三星期后,用相同剂量I蛋白液和弗氏不完全佐剂等体积混合的乳剂,以同样方式再次注射。此后,动物被用100 μ g剂量静脉注射来增加免疫力。所得抗血清滴度约2 μ g/ml。

淋球菌细胞总蛋白经SDS-PAGE分离,并在1A电流下电印渍于NO纸(1小时)。把印渍纸浸入含0.5% Tween 20的

PBS 缓冲液中猝灭 30 分钟，换用新的猝灭液再保温 30 分钟。把 NC 纸转入用同种猝灭液，以 1:20,000 稀释度配制的 I 蛋白抗血清溶液中，室温摇动下反应 3 小时。用猝灭缓冲液洗 3×5 分钟。把 NC 纸转入用猝灭缓冲液稀释的碱性磷酸酶抗-抗体溶液中，室温下反应 2 小时。用猝灭缓冲液洗 3×5 分钟，最后换用二乙基巴比妥酸-乙酸缓冲液 (0.15M, pH9.6) 洗 5 分钟。洗过的 NC 纸转入底物溶液。此时，用二甲基甲酰胺配制的、浓度为 1mg/ml 的 5-溴-4-氯吲哚磷酸，和用二乙基巴比妥酸-乙酸盐缓冲液配制的 1mg/ml 硝基蓝四唑 (NBT)，以及 2MMgCl₂ 作为母液。由这些母液配制的底物溶液有如下组分：20 μ l MgCl₂，1ml 0.1% NBT，0.1ml 吲哚磷酸盐，9ml 二乙基巴比妥酸-乙酸盐缓冲液。NC 纸放在底物溶液中，37 $^{\circ}$ C 下保温直到颜色稳定。

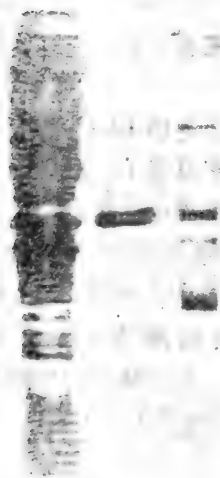


图 4-13 淋球菌外膜 I 蛋白的碱性磷酸酶联免疫检出(说明见正文)

实验结果如图 4-13 所示。其中，a 列为淋球菌全细胞蛋白质经 SDS-PAGE 分离后，用考马斯亮蓝染色的凝胶谱；b 列为提纯了的外膜 I 蛋白如 a 列同样处理所得凝胶谱；c 列是以 a 列为模板印渍于 NC 纸，然后用抗 I 蛋白的兔血清 (I 抗) 和碱性磷酸酶联抗-抗体 (II 抗) 特异性免疫检出

谱。不难看出 c 列至少有四条区带，Blake 等人认为这是内源性酶使 I 蛋白部分降解而引起的。他们又指出，当吲哚磷酸和碱性磷酸酶反应时，底物被裂解为磷酸和吲哚基，此靛蓝的羟基

通过互变异构形成一种酮化物,并在碱性条件下发生二聚作用形成一种脱氢靛蓝。在这种二聚作用过程中释放出的 H^+ 使硝基蓝四唑还原而沉淀,形成了一种强蓝色的二甲腈。他们认为叫羟磷酸和 NBT 在水溶液中更稳定,因此只会产生极少的非特异性沉淀,所得染色谱不仅背景低,区带也不扩散,这些优点有利于定量检出。此外,本法染色谱不褪色利于保存,灵敏度较高,pg 量抗原即能检出。

3. 免疫印盖术的新方法

由于免疫印渍术应用最为广泛,因此新方法层出不穷。例如使用免疫金试剂的免疫印盖法^[90];用链霉抗生物素蛋白-酸性磷酸酶复合物免疫检出法^[47];先经免疫沉淀来浓缩抗原再行免疫印渍和免疫印盖,以提高抗原检出灵敏度的增强方法^[128];用过氧化物酶联和碱性磷酸酶联 II 抗,在同张印渍纸上先后检出两种抗原的连续免疫检出法^[79];先用小分子化合物修饰印渍纸上抗原,再用常规双抗体免疫检出法检出特异性抗原^[59];等。此外,目前已经有不少采用单克隆抗体作为 I 抗的免疫检出报道^[99],他们都认为使用单克隆抗体要比常规双抗体检出法更灵敏 10 倍。限于篇幅,本节只能选用一些比较重要的方法予以具体介绍。

(1) 免疫金试剂检出法 此法实质上是把金溶胶(制法见全谱检出一节)偶联于 II 抗上,例如偶联于 IgG 使之形成金-IgG 复合物^[90],或者偶联于 A 蛋白形成金-A 蛋白复合物^[97]。Brada 和 Roth 在免疫检出人小肠刷状边缘膜,蔗糖酶/异麦芽糖酶(这是一种称为双链双酶的嵌入膜蛋白)的蔗糖酶亚单位中,采用了金-A 蛋白-II 抗免疫检出^[97]。具体做法是,刷状边缘膜蛋白制剂经 SDS-PAGE 分离并印渍于 NC 纸。用内含 0.5% BSA 的 PBS 缓冲液(pH 7.4)于 20°C 下猝灭 2 小时,

再用内含 $26\mu\text{g}$ 针对蔗糖酶亚单位的单克隆抗体的猝灭缓冲液, 于 20°C 下保温 2 小时。经大量猝灭液洗涤 30 分钟除去过量的 I 抗后, 把 NC 条转入蛋白浓度为 $14\mu\text{g}/\text{ml}$, 用猝灭液稀释的兔抗小鼠 IgG 抗体, 在 20°C 下保温 2 小时。过量抗体再用猝灭液洗 30 分钟除去。取金溶胶-A 蛋白复合物母液, 用 PBS 溶液稀释到 $\text{OD}_{525\text{nm}}=0.44$ 。把 4 体积这种溶液和 1 体积胎牛血清混匀, 放入上述洗好的 NC 纸, 于 20°C 下保温 1 小时。然后用 PBS 溶液洗 2×5 分钟, 换用含 1% Triton X-100 的 PBS 液洗 10 分钟, 再在 PBS 中洗 2×5 分钟, 区带显红色。Brada 和 Roth 指出, 此法可检出 50ng 的酶量, 优点是: (i) 避免用 ^{125}I -A 蛋白时的放射性处理; (ii) 染色谱稳定; (iii) 染色快速; (iv) 各区带强度均一, 不会造成假象; (v) 虽说是采用金溶胶, 但价格并不贵, 容易在各实验室中实现。

(2) 抗原修饰后的免疫检出法 免疫检出法中制备 I 抗虽不困难但费时颇多, 尤其制备单克隆抗体时不仅费时也较麻烦。因此设想先用 5'-磷酸吡哆醛 (PLP) 和氢硼化钠 (SB) 来修饰已印渍于固定化基质上的蛋白质, 使形成 5'-磷酸吡哆基 (PPxy) 蛋白质, 然后只需制备直接针对 PPxy 基团的单克隆抗体, 那末任何抗原都可用这种单克隆抗体作为 I 抗来检出, 也只有这样才能使此单克隆抗体成为通用商品^[59]。Kittler 等人的实验证明此设想是可行的, 具体做法如下: 鼠肝细胞抽提液经 SDS-PAGE 分离, 然后电印渍于 NC 纸或 ZB 膜。印渍了的 NC 纸或 ZB 膜用 pH8.0 的 PBS 缓冲液洗去印渍液。把印渍纸转入新配并充氮气的内含 0.3M PLP 的 PBS 液中, 室温下摇 20 分钟。反应后的印渍纸用 PBS 液洗涤除去反应液, 转入新配的内含 300mg/ml 氢硼化钠的 PBS 溶液中, 室温下摇 20 分钟。此时印渍纸上所有蛋白质区带都被修饰成 PPxy-蛋白质复合物。

经上述处理过的印渍纸仍可以用氨基黑 10B 等常规染料染色显现全谱,也可进行免疫检出。后者检出步骤和常规法并无两样,即仍然先做猝灭处理。此时,把修饰过的印渍纸用含 10% BSA 和 2.5% 人血浆的 PBS(pH7.3)溶液,于 45°C 下猝灭 12 小时,再用 PBS(pH7.3)冲洗印渍纸 3×5 分钟。此后即可用单克隆抗-PPxy 抗体作为 I 抗、商品辣根过氧化物酶联羊抗-小鼠 F(ab')₂ 作为 II 抗,以及用二硝基联苯胺和 H₂O₂ 作为酶底物和显色剂,按前述常规步骤进行免疫检出。Kittler 等人的实验指出,此法可检出 ng 量的蛋白质,而且能使目前还难染色的 ZB 膜染色成功^[59]。

事实上,用 PLP 修饰非印渍纸上的蛋白质早有报道。例如,它曾修饰过果糖-1, 6-二磷酸酶^[129]、乳酸脱氢酶^[130]、呼肠孤病毒转录酶^[131]、*E. coli* 起始因子 III^[132] 和延伸因子 G^[133] 等等。有关 PLP 和蛋白质的结合部位,已知是 PLP 和蛋白质中赖氨酸残基的 ϵ -氨基起反应。因此,如果低分子量多肽中赖氨酸较少或缺失时,PLP 修饰的效果就差,或不能修饰。Kittler 等人的实验也证明,用此法染印渍纸上低分子量多肽时染色效果较差。

(3) 双 II 抗酶联连续检出法 1986 年 Theisen 等人报道了用偶联着过氧化物酶和碱性磷酸酶的第 II 抗体,连续检出免疫印渍中两种不同抗原的方法^[79]。他们的具体操作如下:来自人单核白细胞系 U937 的一种离心沉降分部(内含包涵素和氨基己糖苷酶),用 SDS-PAGE 分离并电印渍于 NO 纸。经猝灭缓冲液(内含 3% BSA 的 PBS 液, pH7.4)在室温并缓慢摇动下猝灭一夜后,NO 纸和 I 抗反应。此 I 抗是用免疫亲和法提纯了的人包涵素(Clathrin)去免疫白兔而获得的。将这种兔抗人包涵素,用猝灭缓冲液稀释到最终浓度为 5 μ g/ml,放入印渍纸,于 37°C

下保温 2.5 小时。把 NO 纸用猝灭缓冲液充分洗涤后, 转入用猝灭液稀释 1 万倍的碱性磷酸酶联羊抗兔 IgG 中, 于 20~22°C 保温 2.5 小时。此后用吲哚磷酸和四唑化物的显色步骤则如常规法(见本章七, 2.(4))。此时, 印渍纸上显一条分子量约 180,000 的蓝色区带(图 4-14), 此即是包涵素。把此染色了的 NO 纸用内含 0.5% Tween 20 的 PBS(pH 7.4), 摇动下洗 5×5 分钟, 再用内含 0.5% Tween 20 的 0.1 M 乙酸溶液洗 5×5 分钟, 内含 0.5% Tween 20 的 PBS 液洗 5×5 分钟, 最后转入内含 3% BSA 的 PBS(省去 0.01% NaN_3)中, 室温下静置 1 夜。次日即可进行第二种抗原的检出。此时, 所用 I 抗系用免疫亲和法提纯的人胎盘 β -氨基己糖苷酶 B(β -Hexosaminidase B)免疫白兔而制得。把此 I 抗用没有 NaN_3 的 PBS 液稀释到最终浓度为

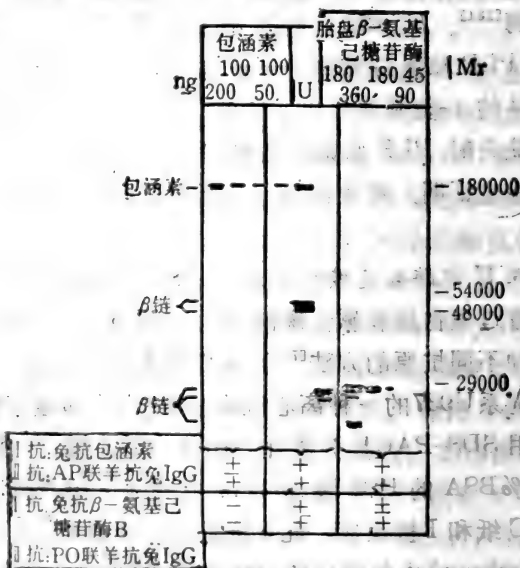


图 4-14 双 II 抗酶顺次免疫检出人单核白细胞系 U937 (U 列) 中包涵素和 β -氨基己糖苷酶的组合和染色谱(说明见正文)

2 μ g/ml 后备用。取上述过夜的 NC 纸, 用没有 NaN_3 的 PBS 液洗 5 \times 5 分钟, 放入 I 抗溶液中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 2.5 小时。NC 纸经同种无 NaN_3 的 PBS 液洗涤后, 转入用 PBS 液稀释 4 千倍 of 过氧化物酶联羊抗-兔 IgG 溶液中, 于 20 \sim 22 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 2.5 小时。此后所用 3, 3'-二氨基联苯胺和 H_2O_2 的显色法如前述常规方法。此时即可看到 NC 纸上另三条显褐色的区带, 这是氨基己糖苷酶 B 的 β -链中间体(图 4-14 之 U 列)。

图 4-14 是 Theisen 等人的实验结果之一, 上部的数字系所用抗原的 ng 数, U 代表 U937 细胞。所以, 除 U 列外, 其它均是经提纯了的包涵素(左侧)或胎盘 β -氨基己糖苷酶的免疫印渍对照谱。图下的 +、- 号表示所用 I、II 抗的情况, + 号为使用过, - 号则没有使用。图右列数字是用蛋白质标准品所定分子量数据。正如 Theisen 所言^[79], 人的 β -氨基己糖苷酶由三种同功酶, 即 A, B 和 S 所组成, 其亚单位组合为 $\alpha\beta$ 、 $\beta\beta$ 和 $\alpha\alpha$ 。来自胎盘的 β -链主要显现为分子量约为 29,000 的一群区带, 而在 U937 细胞中则显现为分子量分别为 48,000, 50,000 和 51,000 三条相关的区带, 用同位素法已证明它们是 β -链的中间加工物^[134]。Theisen 等人得出结论说, 先后用碱性磷酸酶联和过氧化物酶联 II 抗, 可以毫不含糊地顺次检出两种抗原, 这是因为两种 II 抗检出的产物颜色不同, 前者显蓝色, 后者为褐色, 它们极易辨别^[79]。

综上所述, 免疫检出方法虽多但其操作步骤无非均是保温、洗涤之类, 只要掌握并选择好所用试剂和反应条件, 就不难获得良好结果。值得提出的是, 近年来已有一批蛋白质分子量标准系列商品市售。其中适于免疫原分子量测定的已有许多报道, 例如预染蛋白质分子量标准系列^[135]; 联接有异硫氰酸盐荧光化物的蛋白质分子量标准系列^[136]; 用常规蛋白质分子量标准系列免

瘦白兔制成的蛋白质分子量标准系列免疫兔血清^[77]，偶联生物素的蛋白质分子量标准系列^[137]等。这种情况充分表明，生物大分子印渍术已经处在整体配套、越来越完善的阶段。

参 考 文 献

- [1] 范培昌等, 生物化学杂志, 1(1): 37, 1985.
- [2] 范培昌等, 生物化学与生物物理学报, 19(6): 493, 1987.
- [3] 范培昌等, 生物化学杂志, 2(1): 25, 1985.
- [4] 范培昌等, 实验生物学报, 20(2): 225, 1987.
- [5] 范培昌等, 生物化学与生物物理学报, 18: 349, 1986.
- [6] 莽克强等, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 科学出版社, 1975.
- [7] Deyl, Z. (ed.), Electrophoresis, Part A: Techniques, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, 1979.
- [8] Deyl, Z. (ed.), Electrophoresis, Part B: Application, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, 1983.
- [9] Andrews, A. T. (ed.), Electrophoresis: Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical applications, Clarendon Press, Oxford, 1981.
- [10] Southern, E. M., J. Mol. Biol., 98: 513, 1975.
- [11] Svoboda, M. et al., Anal. Biochem., 151: 16, 1985.
- [12] Legochi, R. P. et al., *ibid.*, 111: 385, 1981.
- [13] Bittner, M. et al., *ibid.*, 102: 459, 1980.
- [14] Vaessen, R. T. M. J. et al., FEBS Lett., 124: 193, 1981.
- [15] Howe, J. G. and J. W. B. Hershey, J. Biol. Chem., 256: 12836, 1981.
- [16] Erickson, P. F. et al., J. Immunol. Methods, 51: 241, 1982.
- [17] Johnson, T. K. et al., Anal. Biochem., 143: 196, 1984.
- [18] Anbertin, A. M. et al., *ibid.*, 131: 127, 1983.
- [19] Elkon, K. B. et al., *ibid.*, 140: 208, 1984.
- [20] Frossard, P. et al., *ibid.*, 134: 265, 1983.
- [21] Gershoni, J. M. et al., Biochim. Biophys. Acta, 856: 19, 1986.
- [22] Bartles, J. R. and A. L. Hubbard, Anal. Biochem., 140: 284, 1984.
- [23] Loeb, M. R., *ibid.*, 143: 196, 1984.
- [24] Manabe, T. et al., *ibid.*, 143: 39, 1984.
- [25] Robert, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 3116, 1979.
- [26] Gibson, W., Anal. Biochem., 118: 1, 1981.

- [27] Goodman, D. and H. Matzura, *ibid.*, 42: 481, 1971.
- [28] Choules, G. L. and B. H. Zimm, *ibid.*, 13: 336, 1965.
- [29] Anker, H. S., *FEBS Lett.*, 7: 293, 1970.
- [30] Hansen, J. N., *Anal. Biochem.*, 76: 37, 1976.
- [31] O'Connell, P. B. H. and C. J. Brady, *ibid.*, 76: 63, 1976.
- [32] Tas, J. et al., *ibid.*, 100: 264, 1979.
- [33] Johnson, T. K. et al., *ibid.*, 133: 126, 1983.
- [34] Song, P. S. and C. N. Ou, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 346: 355, 1980.
- [35] Weisehahn, G. P. et al., *Biochemistry*, 16: 925, 1977.
- [36] Schen, C. K. et al., *J. Mol. Biol.*, 116: 661, 1977.
- [37] Stanfield, S. and D. R. Helinski, *Cell*, 9: 333, 1976.
- [38] Flanagan, S. D. and B. Yost, *Anal. Biochem.*, 140: 510, 1984.
- [39] Taylor, G. R., *ibid.*, 148: 524, 1985.
- [40] Lin, W. and H. Kasamatsu, *ibid.*, 128: 302, 1983.
- [41] Wiser, M. F. and H-G. Schweiger, *ibid.*, 155: 71, 1986.
- [42] Presswood, W. G., *Membrane Filtration: Applications, Techniques, and Problems* (Dutka, B. J. ed.), Dekker, New York, 1981.
- [43] Gershoni, J. M. and G. E. Palade, *Anal. Biochem.*, 131: 1, 1983.
- [44] 朱运松等, *生物化学与生物物理进展*, 6: 56, 1984.
- [45] 黄承权等, *同上*, 6: 59, 1986.
- [46] Nathew, C. G. P., *Techniques in Molecular Biology* (Walker, J. M. and W. Gasstra, eds.), pp. 273-285, Croom Helm Ltd., London, 1983.
- [47] Faub, O. et al., *Virology*, 92: 310, 1979.
- [48] Towbin, H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350, 1979.
- [49] Kakita, K. et al., *Diabetes*, 31: 648, 1982.
- [50] Kay, M. M. B. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 1631, 1983.
- [51] Alwine, J. C. et al., *ibid.*, 74: 5350, 1977.
- [52] Towbin, H. and J. Gordon, *J. Immunol. Methods*, 72: 313, 1984.
- [53] Alwine, J. C. et al., *Enzymol. Methods*, 68: 220, 1979.
- [54] Reiser, J. and J. Wardale, *Eur. J. Biochem.*, 114: 569, 1981.
- [55] Stellwag, E. J. and A. E. Dahlberg, *Nucleic Acids Res.*, 8: 299, 1980.
- [56] Bhullar, B. S. et al., *J. Biol. Chem.*, 256: 8801, 1981.
- [57] Taylor, G. R., *Anal. Biochem.*, 148: 524, 1985.
- [58] Flanagan, S. D. and B. Yost, *ibid.*, 140: 510, 1984.

- [59] Kittler, J. M. et al., *ibid.*, 137: 210, 1984.
- [60] Hossenlopp, P. et al., *ibid.*, 154: 138, 1986.
- [61] van den Berg, K. J., *ibid.*, 155: 149, 1986.
- [62] Schaltmann, K. and O. Pongs, *Hoppe-seyler's Z. Physiol. Chem.*, 361: 207, 1980.
- [63] Gooderham, K., *Techniques in Molecular Biology* (Walker, J. M. and Gasstra, W. eds.), pp. 49—61, Croom Helm Ltd., London, 1983.
- [64] 戴莹 and M. S. Chqzyer, *中华微生物学与免疫学杂志*, 4(5): 271, 1984.
- [65] Bowen, B. et al., *Nucleic Acids Res.*, 8: 1, 1980.
- [66] Sutton, R. et al., *J. Immunol. Methods*, 52: 183, 1982.
- [67] Reiser, J. and J. Wradale, *Anal. Biochem.*, 114: 569, 1981.
- [68] 周翊钟等, *中华微生物学与免疫学杂志*, 5(1): 62, 1985.
- [69] Batteiger, B. et al., *J. Immunol. Methods*, 55: 297, 1982.
- [70] Burnette, W. N., *Anal. Biochem.*, 112: 195, 1981.
- [71] Falk, B. W. and C. Elliott, *ibid.*, 144: 537, 1985.
- [72] 潘华珍等, *生物化学与生物物理学进展*, 1: 35, 1986.
- [73] Hancock, K. and V. C. W. Tsang, *Anal. Biochem.*, 133: 157, 1983.
- [74] Blake, M. S. et al., *ibid.*, 136: 175, 1984.
- [75] Bradbury, W. C. et al., *ibid.*, 137: 129, 1984.
- [76] Miller, B. et al., *Neurology*, 34: 695, 1984.
- [77] Carlone, G. M. et al., *Anal. Biochem.*, 155: 89, 1986.
- [78] Mascher, E. and P. Luncclahl, *Biochim. Biophys. Acta*, 856: 505, 1986.
- [79] Theisen, N. et al., *Anal. Biochem.*, 152: 211, 1986.
- [80] Moeremans, M. et al., *ibid.*, 145: 315, 1985.
- [81] Alric, M. et al., *ibid.*, 155: 328, 1986.
- [82] Keren, Z. et al., *ibid.*, 155: 182, 1986.
- [83] Szewczyk, B. and L. M. Kozloff, *ibid.*, 150: 403, 1985.
- [84] Moeremans, M. et al., *ibid.*, 153: 18, 1986.
- [85] Stott, D. J., et al., *ibid.*, 149: 454, 1985.
- [86] Bellon, G., *ibid.*, 150: 183, 1985.
- [87] Thompson, G. A. et al., *ibid.*, 148: 288, 1985.
- [88] Dion, A. S. and A. A. Pomenti, *ibid.*, 147: 525, 1985.
- [89] Brower, M. S. et al., *ibid.*, 147: 382, 1985.
- [90] Hsu, Y-H., *ibid.*, 142: 221, 1984.
- [91] Kuonen, D. R. et al., *ibid.*, 153: 221, 1986.

- [92] Ohlsson, B. G. et al., *ibid.*, 152: 239, 1986.
- [93] Dean, D-P, et al., *ibid.*, 152: 329, 1986.
- [94] Cardin, A. D. et al., *ibid.*, 137: 363, 1984.
- [95] Domin, B. A., *ibid.*, 136: 390, 1984.
- [96] Knecht, D. A. and R. L. Dimond, *ibid.*, 136: 180, 1984.
- [97] Brada, D. and J. Roth, *ibid.*, 142: 79, 1984.
- [98] Steup, M. and K-P. Gerbling, *ibid.*, 134: 96, 1983.
- [99] De Blas, A. L. and H. M. Cherwinski, *ibid.*, 133: 214, 1983.
- [100] Tsang, V. C. W. et al., *Enzymol. Methods*, 92: 377, 1983.
- [101] Wojtkowiak, Z. et al., *Anal. Biochem.*, 129: 486, 1983.
- [102] Miskin, R. and H. Soreq, *ibid.*, 118: 252, 1982.
- [103] Yuen, K. C. L. et al., *ibid.*, 126: 396, 1982.
- [104] Hayman, E. G. et al., *J. Cell Biol.*, 95: 20, 1982.
- [105] Swerdlow, P. S. et al., *Anal. Biochem.*, 156: 147, 1986.
- [106] Neumaier, M. et al., *ibid.*, 156: 76, 1986.
- [107] Towbin, H. et al., *J. Biol. Chem.*, 257: 12709, 1982.
- [108] Johansm, K. O. and C. S. McHenry, *ibid.*, 257: 12310, 1982.
- [109] Nielsen, P. J. et al., *ibid.*, 257: 12316, 1982.
- [110] Radford, A. J., *Anal. Biochem.*, 134: 269, 1983.
- [111] 李宝珪等, *生物化学与生物物理进展*, 3: 46, 1986.
- [112] 周翊钟等, *中华微生物学与免疫学杂志*, 5(1): 62, 1985.
- [113] Wallis, C. et al., *Ann. Rev. Microbiol.*, 33: 413, 1979.
- [114] Gershoni, J. M. and G. E. Palade, *Anal. Biochem.*, 124: 396, 1982.
- [115] Petit, C. et al., *Ann. Immunol.*, 133: 77, 1982.
- [116] Falk, B. W. and C. Elliott, *Anal. Biochem.*, 129: 486, 1983.
- [117] Cohen, M. L. and S. Falkow, *Science*, 211: 842, 1981.
- [118] Hancock, K. and V. C. W. Tsang, *Anal. Biochem.*, 133: 157, 1983.
- [119] Swanstro, R. et al., *Anal. Biochem.*, 98: 231, 1979.
- [120] Merrill, C. R., *Science*, 211: 1437, 1981.
- [121] Radford, A. J., *Anal. Biochem.*, 134: 269, 1983.
- [122] Schleif, R. F. and P. C. Wensink, (章静波等译), *分子生物学实用方法*, pp. 151~157, 人民卫生出版社, 1985.
- [123] Southern, E., *Enzymol. Methods*, 68: 152, 1979.
- [124] Amasino, R. M., *Anal. Biochem.*, 152: 304, 1986.
- [125] Sikora, K. and H. M. Smedley, (范培昌、秦德安译), *单克隆抗体*, pp. 18

—26. 上海科学技术文献出版社, 1987.

- [126] 王益寿, 葡萄球菌 A 蛋白, 安徽科学技术出版社, 1984.
- [127] O'Connor, C. G. and L. K. Ashman, J. Immunol. Methods, 54: 267, 1982.
- [128] Wiser, M. F. and H-G, Schweiger, Anal. Biochem., 155: 71, 1986.
- [129] Columbo, G. and F. Marcus, Biochemistry, 13: 3085, 1974.
- [130] Gould, K.G. and P. C. Engel, Arch. Biochem. Biophys., 215: 498, 1982.
- [131] Morgan, E. M. and D. W. Kingsbury, Biochemistry, 19: 484, 1980.
- [132] Ohsawa, H. and C. Gualerzi, J. Biol. Chem., 256: 4905, 1981.
- [133] Giovane, A. et al., Biochemistry, 21: 5224, 1982.
- [134] Hasilik, A. and E. F. Neufeld, J. Biol. Chem., 255: 4937, 1980.
- [135] Tsang, V. C. W. et al., Anal. Biochem., 143: 304, 1984.
- [136] Law, H. and C. A. Lingwood, ibid., 149: 404, 1985.
- [137] Della-Penna, D. et al., ibid., 152: 329, 1986.

第五章 有关印渍的其它技术

生物大分子印渍术发展极为迅速,除所用装置日趋完善和配套成龙外,在方法学和印渍类型诸方面都有很大发展。例如,在方法学方面,发展出点印渍术(Dot blotting)^[1];印渍纸上生物分子的原位修饰术^[2];"抹去(Erased)"印渍纸上探针,使同张印渍纸能用多种探针连续探测的"抹除术(Erasing)"^[3];把探针先结合于整张印渍纸,再印渍检出凝胶上探针识别的生物分子的强化主动转移(Facilitated active transfer)^[4]等。目前,印渍术也开始进入制备目的,提出了从印渍纸上洗脱蛋白质的方法和条件^[5]。在印渍类型方面也已经从核酸和蛋白质两大类扩展到细胞和其它生物分子(包括小分子量的生物分子)。例如脂多糖印渍(LPS blotting)^[6]、细胞印渍(Cell blotting)^[7]、配体印渍(Ligand blotting)^[8]、产物选择性印渍(Product-selective blotting)^[9]等。显然,限于篇幅,本章不可能全面而详细地介绍这些极为有前途的方法。然而作者希望通过本章所选内容,能使读者了解到印渍术的发展趋势。

一、点 印 渍 术

点印渍术有许多同义词(详见第一章),但不难从各种名称所冠 Dot 或 Spot 一词,以及出示的小圆点或小方块图谱(如图 1-2c、图 3-18 和图 3-19)辨认出它属常规印渍术还是点印渍。例如文献[10]所指“一种快速鉴定 NC 纸上蛋白质的简便方法”

实为点印渍术;而文献[11], 题目虽为“圆点滤膜杂交法”, 其内既有常规印渍术图谱也有点印渍图谱, 实是两种方法的比较实验。当然, 点的几何形状可以是圆点, 也可以是小方块点(图 3-18 和 3-19), 因此 Dot 或 Spot 一词译为“点”将更灵活些。

Towbin 和 Gordon 指出, 印渍术中如果电泳分辨率不是必须的, 那末就可把样品直接以任何所希望的几何形状, 点于固定化纸进行固相检测, 以此达到多样品同时检出、高灵敏度和操作简化的目的^[12]。由此可见, 点印渍术和常规印渍术的主要差别在于前者不经凝胶电泳和印渍步骤。因此, 严格地讲, 点印渍应不属印渍术的范畴, 但由于二者后续步骤完全相同, 加之点印渍常作为常规印渍术筛选印渍条件的先行步骤而被列入印渍术^[12]。

1. 点印渍的操作要点

点印渍术是把一系列样品直接点于固定化纸。通常是用 0.5 或 $1\mu\text{l}$ 体积的微量输液器, 把样品重复点在印渍纸上。Towbin 小组曾使用过一种可注射皮克(pg)量的驱动器(Hamilton Microlab M 型)点样, 能反复输送 $0.1\mu\text{l}$ 体积的样品, 从而加快了点样速度和增加了点样数目^[12]。尽管如此, 逐滴点样始终是一项费时又麻烦的操作, 点间距离也难控制 (Towbin 等人则在固定化纸上划上格子^[12])。第三章中曾提及 Alric 等人于 1986 年设计的一种点印渍装置(图 3-17)^[13], 他们以条式点样, 同时能检出 600 余点而值得重视。从理论上讲, 所有印渍用纸都能用于点印渍^[14], 但目前大多应用 NC 纸^[10~13]。而且认为, 把样品直接点于干的 NC 纸, 斑点不易扩散, 相邻斑点不会因互相衔接而干扰^[12]。

点印渍术若用分子亲和技术来检出特异性分子时, 也需如常规印渍术那样猝灭去印渍纸上非特异性探针结合部位。所用

猝灭剂也如常规印渍术。一般认为,用马血清作猝灭剂对通常的免疫检出就足够了^[12]。胎牛血清的猝灭效率差,且较昂贵,不宜使用^[12]。当用免疫检出法测定核酸时,因全血清中存在核酸酶,常改用抗-DNA 抗体的血清^[15]。Towbin 等人从自体免疫小鼠筛选杂种瘤的点印渍术中,采用 1mg/ml BSA 和 0.1% Nonidet P-40 混合物作为猝灭剂^[12]。点印渍的猝灭步骤和常规印渍术相同,只需将点样后的印渍纸,浸入猝灭缓冲液中保温一段时间即可。其后检出步骤中,猝灭剂也始终存在,以便使背景达最小值。

点印渍术的检出方法除全谱显现^[10]外,常用分子亲和技术检出。如核酸类的分子杂交^[11],抗原类的免疫亲和检出等。后者也包括过氧化物酶标^[16]、¹²⁵I-A 蛋白标记^[17]等等,具体操作也如常规印渍术。此外,也常采用单克隆抗体作为 I 抗^[18]。

点印渍虽是一种有效的定性方法,但它也用作定量检出。此时,或用反射式密度计定量扫描斑点的酶联染色物^[19],或通过放射自显影检出¹²⁵I 标记探针^[17]。Hawkes 曾指出,NC 纸上结合免疫球蛋白的量和光密度之间,当使用已知量点印渍的免疫球蛋白作标准曲线时,有如下定量关系式^[20]:

$$Y = A \log(x + B)$$

式中, Y 是光密度值; x 是结合免疫球蛋白的量, A 和 B 是实验常数。后来,此式被修改为:

$$1/Y = A/x + B/x^2 + C$$

式中, C 亦是实验常数^[21]。此法可测得 100 pg/ml 蛋白质。Towbin 小组还为这种用反射式密度计的定量测定编写了原始数据处理的计算机程序^[12]。

2. 点印渍操作实例

这里以 Sternberg 和 Jeppesen 用点印渍术从杂种瘤培养

物筛选针对染色体蛋白质的单克隆抗体的实验为例^[18]，来说明点印渍操作全过程。如所周知，单克隆抗体生产中最关键的因素之一，是从众多的培养上清液中筛选出相关抗体。过去这类筛选是在微量滴定塑料板上进行，此法的成功率取决于抗原结合于塑料表面的能力^[22]。现在采用点印渍术，象染色体这样的微粒抗原都容易和 NC 纸结合。而且，用 SDS 增溶的抗原也可与之直接结合。Sternberg 和 Jeppesen 实验的具体操作如下^[18]：从中国大田鼠 Don K2 细胞分离的染色体或细胞核等，悬浮于样品缓冲液(1%SDS, 50 mM DTT, 6.25 mM Tris-HCl, pH6.8)，用一根玻璃毛细管吸取样品，以一系列小圆点的形式，点样于直径为 92 mm 的圆形 NC 纸上。由于 NC 纸事先已划成 5 mm² 的方格网，点样时，样品液可点在网格的交叉点处。每点样品体积约 0.5 μ l，这相当于 0.1~1.0 μ g 蛋白质量。点样毕，NC 纸放入含 5% BSA 的 TN 液(0.9% NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4)中，在室温下保温 30 分钟进行猝灭。把 NC 纸放在同样大小的一张普通滤纸上，此滤纸事先用同种猝灭液饱和过，然后一起放在一只 90 mm 直径的塑料佩特里培养皿的盖中。单克隆抗体 4G8 和 2O6 来源于小鼠骨髓瘤细胞系 P3-NS1-Ag4-1，和用 SDS 增溶的染色体核心蛋白(Chromosome core protein)免疫的、小鼠 BALB/C 株的脾细胞之融合物。所以，在点印渍的筛选过程中，是把杂种瘤各培养物上清液，以 1 μ l 等分的量点在上述已猝灭过的 NC 纸上(即也点在网格的交叉点处)。此步实为常规印渍术的印盖(Overlay)，培养物上清液则作为 I 抗。把培养皿盖好，预防液体蒸发。室温下 30 分钟后取出 NC 纸，用 100 ml TN 液短暂洗涤一下，放入 100 ml TN 液中浸 10 分钟。再转入内含 0.05% NP 40 的 100 ml TN 液中浸 10 分钟，最后又转入 100 ml TN 液中洗 10 分钟。此步

主要除去 I 抗, NP 40 则是为了减低背景。把洗好的 NC 纸放入内含 5×10^5 cpm/ml ^{125}I -标记 $\text{F}(\text{ab})_2$ 兔抗-小鼠 IgG 和 5% BSA 的 20ml TN 液中,于室温摇动下反应 45 分钟,然后按 I 抗反应后的洗涤步骤洗涤。洗涤结束,把 NC 纸在真空下干燥并进行放射自显影。由此流程可知,点印渍术除直接点样于 NC 纸外,其它操作都和常规印渍术相类同。

图 5-1 是 Sternberg 和 Jeppesen 的实验结果之一。此时,他们把一系列的抗原按纵列点在 NC 纸上。其中, a 列为对照,系采用低分子量蛋白质标准系列; b 和 g 列为染色体; c 列为染色体核心蛋白; d 和 h 列为细胞核; e 列是用 2M NaCl 和 DNase I 处理过的细胞核; f 列为微管蛋白(Tubulin)和肌动蛋白。a~f 列的抗原样品汇中加有 SDS, g 和 h 列未加。两种单克隆抗体印盖行如图箭头所示。此结果表明,点印渍术对抗体特异性的初步分析是非常有用的。图 5-1 指出,单克隆抗体 4G8 能和 SDS 变性了的染色体和细胞核结合,却不能和未变性的这两种抗原制剂结合;单克隆抗体 2C6 则全能结合。

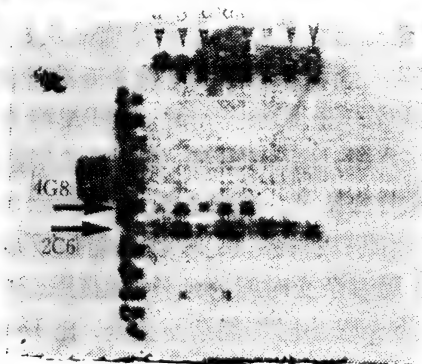


图 5-1 单克隆抗体 4G8 和 2C6 对不同抗原反应性的点印渍分析(说明见正文)

3. 点印渍应用概述

点印渍术虽说历史不足十年,但其应用已经非常广泛。由于点印渍是把样品直接点于固定化纸(样品未经电泳分离),因此大多应用于欲筛选和比较大量实验样品的研究目的中。

(1) 在分子生物学领域的应用 大多应用于核酸分子杂交反应的条件筛选实验中^[23]。例如, Amasino 为了研究聚乙二醇(PEG)是否会比常规所用的核酸分子杂交的加速剂——葡聚糖硫酸酯(DexSO₄)更有效,就采用点印渍术来做比较实验^[24]。他先把 A6Ti 质粒放入 100mM NaOH 中煮沸 5 分钟,使解为单链。加入 1/2 体积 1M Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0),再用水稀释到 DNA 浓度为 20 pg/ μ l。然后,按每点 5 μ l 直接点于干的 ZB 膜上,共 12 列,每列 3 点。点样毕, 80°C 下烘干 2 小时使 DNA 牢固结合于 ZB 膜。杂交时,把 ZB 膜按列裁开,共分为三组,每组 4 列,分放于: 一组,不加;二组,加有 10% PEG (Mr=6~7.5 $\times 10^3$);三组,加 10% DexSO₄ (Mr=5 $\times 10^5$)的杂交反应液 (pH 7.2, 0.25 M NaH₂PO₄, 0.25 M NaCl, 7% SDS, 1 mM EDTA, 1 $\times 10^5$ cpm/ml [³²P]GTP-单链 RNA)中,于 42°C 摇动下进行杂交反应。各组分别于 4、8、12 和 24 小时处取出一条,用 2 \times SSC 液在室温下洗涤 5 分钟使反应终止。转入 0.25M NaH₂PO₄-2% SDS-1 mM EDTA 溶液中,于 65°C 洗两次,每次 20 分钟。取出 ZB 膜,用普通滤纸按压使干,封入塑料袋后进行放射自显影。结果如图 5-2 所示,不加加速剂者,杂交 24 小时后才能勉强检出。DexSO₄ 能加速杂交速率,4 小时后即可检出,随着杂交时间的延长,信号逐渐加强。然而 PEG 效果最佳,8~12 小时即能杂交完全,比 DexSO₄ 提高 2~10 倍。

由上实验可知点印渍术在选择最佳实验条件中,是十分有

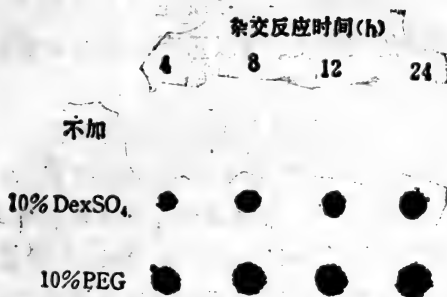


图 5-2 加速剂 DexSO₄ 和 PEG 对核酸分子杂变速率的影响

用又简便易行的技术。Taylor 在研究双链 DNA 能否被印渍于 ZB 膜的研究中,也是采用点印渍作为先行步骤,以便在大量条件试验中选出最佳方案^[25]。此外,点印渍术也可作为基因调控的研究工具。例如甲胎蛋白和白蛋白已被用于肝癌发病机理和治疗,以及真核细胞基因表达的研究指标^[26],于是有人用点印渍术定量测定大鼠甲胎蛋白和白蛋白基因转录产物——mRNA_{AFP} 和 mRNA_{Alb},借此研究基因调控,寻找肝癌发病机理^[11]。

(2) 在医学中应用 点印渍术在医学中的应用报道最多^[12]。对临床诊断而言,点印渍术具有很大吸引力。因为,它容许在一张固定化纸上实现几十个,乃至几百个^[13]分析,若采用免疫印盖又将能以高灵敏度检出抗体。现已证明,点印渍能容易地完成免疫球蛋白类型的特异性分析,这是临床诊断最为需要的。Hawkes 等人就曾为此目的,利用现有市售配套抗原,用点印渍术进行了这类血清学筛选试验^[16]。现在,国外已有一套标准补体(Complement)系列,可用于点印渍术诊断呼吸道感染疾病,包括腺病毒、衣原体、流感、流行性腮腺炎、支原体、Q 热等等^[12]。Walsh 等人更用此系列检验 IgE 和两种过敏原——尘

螨和蜜蜂毒液^[27]。他们指出,该系统是对 IgE 特异性的,在血清检验中有着足够的灵敏度、可以重现,变化系数只在 3~6% 之间

Gordon 和 Rosenthal 曾为结缔组织疾病建立了一套自身免疫图谱,用来测定抗-DNA 抗体、风湿病因子,以及测定 HeLa 细胞亚细胞分部的抗体^[21]。他们指出,此法可和常规测定风湿病因子和抗细胞核因子 (Anti-nuclear factor) 检验法相关联,并用于临床诊断。目前此法已用国际参比血清使之标准化。

Pappas 等人应用点印渍诊断内脏利什曼病^[28]。他们指出,此法所需抗原量要比常规法少得多。又指出,此法也可用于棘球蚴病和球孢子菌病的诊断。

(3) 在生物化学等领域的应用 van der Berg 创造了用点渍术测定胸苷激酶 (简称 TK; EC2.7.1.21) 酶活性的方法^[29]。他不但用点印渍详细研究了测此酶活性的最佳方案,也用点印渍比较了各种类型造血细胞的 TK 活性。此法的根据是,TK 的等电点在 pH 5.6~5.8 处,高于此值带负电。如果把它点在带阳电的离子交换纤维素纸 DE 81 上,再用放射性碘化的底物,如 ¹²⁵I-脱氧胞苷 (IdC) 或 ¹²⁵I-脱氧尿苷 (IdU),与之反应,因它们经酶促磷酸化后具强负电性而被结合于 DE 81 纸。如果没有酶活性,这类底物因无这种强负电性,将被反应后的洗涤步骤除去。通过放射自显影,凡显放射性的斑点即表明具酶活性。放射性强度和酶的比活力呈线性关系,从而求得酶活力^[29]。图 5-3 是 van der Berg 用各种物种的细胞抽提液所测 TK 酶活力的点印渍谱。其中, a 行用 IdU 作底物; b 行用 IdC 作底物。图中, MC-6 和 KY893 分别是被单纯性疱疹病毒 (Herpes Simplex Virus; 简称 HSV) 转化的鼠成纤维细胞系和细菌系,二者均含 TK。WEHI-3, CEM-4, MOLT-4 以及



图 5-3 哺乳动物和细菌细胞中 TK 活力的点印渍测定放射自显影谱(说明见正文)

HSB-2 均为淋巴样细胞系。其中, HSB-2 是 TK 缺失株。由图 5-3 可知, 各细胞株含不同水平的 TK 活性, 缺失 TK 的变株不能在图谱中看到任何斑点痕迹, 而 KY 893 和小鼠骨髓的细胞抽提液中含有最高 TK 活性。最有意义的是, MC-6 株分别用 IdU 和 IdC 作为底物(比较图 5-3 第一列)时, TK 活性相差很大。早有报道, IdU 是 TK 同工酶的特异性底物。由此可以推论, 本法尚能用于同工酶之检出。

Gershoni 等人在进行细胞印渍的实验中用点印渍法作了试探性实验, 最后又用点印渍作了验证实验^[30]。他们设想, 病毒感染正常生活细胞必先对细胞进行选择性的结合。也就是说正常细胞上有病毒的受体蛋白, 且很可能是具糖链的糖蛋白。为了论证这一设想, 他们把红细胞膜(影泡)按 $0.7 \mu\text{g}$ 的蛋白质量点于 NC 纸, 经猝灭步骤后, 或用 ^{125}I -标记的付流感病毒; 或用 ^{125}I -标记的从副流感病毒外壳提纯的糖蛋白作为探针进行印盖, 结果如图 5-4。图中 a 列为红细胞膜样品; b 列为红细胞样品点于 NC 纸后用 $120 \mu\text{g}$ 未标记的活的付流感病毒于 4°C 下保温 1 小时; c 列如 b 列, 但再用 $120 \mu\text{g}$ 二硫苏糖醇 (DTT) 处理使活病毒失活; d 列如 a 列, 但点样后用 1 U/ml 的唾液酸酶(在 pH 5.5 乙酸缓冲液中)浸泡 NC 纸 1 小时(37°C), 然后用 PBS 洗两

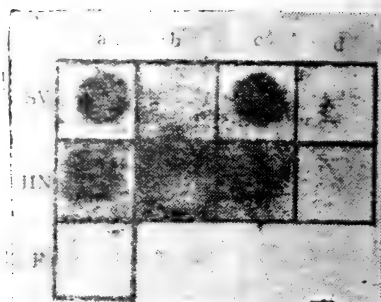


图 5-4 用点印渍术探测付流感病毒及其外壳糖蛋白对各种处理红细胞膜之结合(说明见正文)

次。上述各列处理完成后, 再按行用 ^{125}I -标记探针印盖。其中, SV 行系用碘标记副流感病毒(SV)印盖; HN 和 F 行系分别用碘标记的, 从付流感病毒外壳提纯的血细胞凝集素/唾液酸酶糖蛋白 (Hemagglutinin/Neuraminidase glyco-protein; 简称 HN), 以及融合因子——F 糖蛋白(F)印盖。由图 5-4 可知, 副流感病毒是能 and 红细胞膜结合的(SV/a 点), 这种结合是通过病毒外壳的 HN 糖蛋白(HN/a 点), 而不是 F 糖蛋白(F/a 点)来实现的。图 5-4 也证明, 红细胞膜中和副流感病毒相结合分子, 是末端具唾液酸残基的糖蛋白类。因为, 用唾液酸酶处理过的红细胞膜, 就不能结合病毒了(见 SV/d 和 HN/d 点)。该实验再表明, 点印渍术也可用于竞争性实验。图 5-4 中, SV/b 点系在红细胞膜点样后用未标记活的副流感病毒与之结合, 然后再用 ^{125}I 标记同种病毒印盖。由于结合位点已被前者占用, 后者就不能再与之结合, 故不能显现放射性斑点。然而, 如果用 DTT 这类还原剂使前者失活, 则碘标记病毒又能和红细胞膜结合了(看 SV/c 和 HN/c 点)。这一实验启示, 点印渍术是初探生物分子间、细胞与生物分子间相互作用分子机理的良好而又

快速的方法。

点印渍术也已步入定量阶段。Domin 等人在研究兔肝微粒体悬液中细胞色素 P-450 (Cyt P-450) 同工酶的工作中, 用点印渍定量检出 Cyt P-450 II 型^[19]。图 5-5 是他们用不同浓度、经提纯的细胞色素 P-450 II 型所得的标准曲线。此时, 他们把提纯的 CytP-450 II 按图所列 8 种浓度点于 NC 纸, 然后用过氧化物酶联免疫方法使之显色, 最后用弱激光扫描仪扫描。所得结果用矩形坐标计算, 证明峰高和 Cyt P-450 II 型浓度呈正

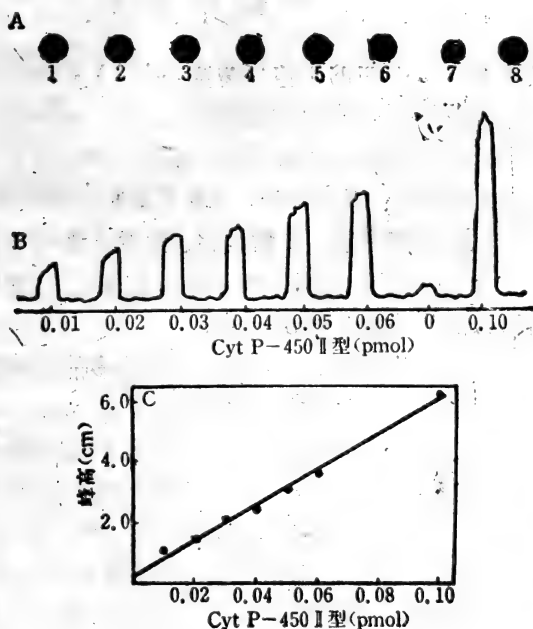


图 5-5 经提纯的 Cyt P-450II 型的点印渍定量分析

A. 不同浓度(其量和 B 谱相对应)的 CytP-450 II 型点印渍酶联免疫检出谱; B, A 的弱激光扫描谱; C 为 Cyt P-450 II 浓度和峰高作图所得标准曲线。

比。图中标准曲线起始点未通过零点是由斑点背景(图5-5中A行之7)所引起。由此可见,点印渍定量分析是可行的,就Cyt P 47-II型而言,最小检出值为0.01 pmol,是相当灵敏的。当然,弱激光扫描仪极为昂贵,设计出更方便、价廉,适用于不透明固定化纸扫描定量的装置,是当代印渍术能否更快发展的关键问题之一。

二 细胞印盖术

迄今,有关这方面的报道仅数篇,但因关系到印渍术的另一发展方向,值得重视。所谓细胞印盖(Cell overlay),是指常规印渍术中使用完整细胞、病毒等作为探针,借此研究细胞和生物分子间的相互作用。现已知道,许多重要的生物学现象,如象细胞的形态发生、伤口愈合、肿瘤转移、病毒感染等等都与细胞和外界物质、细胞和细胞之间的相互粘着有关。这种粘着有选择性,是由双方的生物分子所决定的。

Hayman 等人指出,人血清中含有许多能和细胞结合的蛋白质,其中经很好鉴定过的是纤连蛋白(Fibronectin)^[7]。为了了解人血浆或血清中还存在哪些这类可以结合细胞的蛋白质,他们用细胞印盖术进行了探测。具体做法是,他们先把人血浆用 SDS-7%PAGE 进行蛋白质电泳分离。为了使血浆中所含较少蛋白质能充分显现,在电泳前他们用 Affi-gel Blue 和 A 蛋白-Sepharose 柱,亲和层析除去大部分血浆中所含最大量的蛋白质成份——清蛋白和 IgG。电泳后把凝胶一分为二,一份用考马斯亮蓝 R-250 染色显现全谱,另一份作为印渍模板电印渍于 NO 纸。印渍后把 NO 纸浸入 500 ml, 内含 5 mg/ml BSA 的 PBS 液中猝灭 16 小时。经 PBS 液洗涤后,把 NO 纸放入鼠

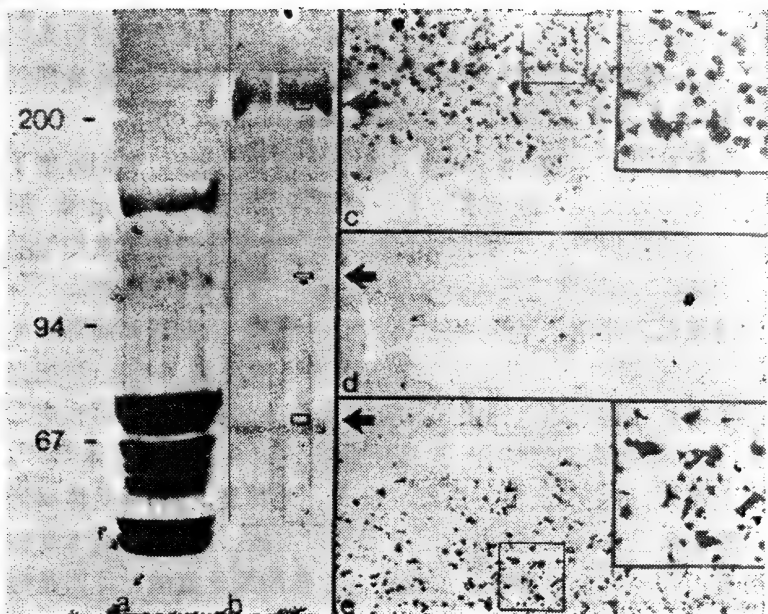


图 5-6 鼠肾细胞印盖人血浆蛋白质印渍谱的显现

a, 考马斯亮蓝染凝胶的显色谱; b, 氨基黑染 NC 纸上人血浆蛋白的鼠肾细胞印盖谱; c~e, 从 b 谱上所示相应位置小方块处取样, 用光学显微镜 ($\times 66$ 倍) 观察所得显微照片。

肾单细胞悬液(10^7 细胞/50 ml), 于 37°C 下保温 1 小时。反应毕, 取出印渍纸用 PBS 洗涤, 然后放入 3% 多聚甲醛 (Paraformaldehyde) 中固定, 再用含 0.1% 氨基黑 10B 的 45% 甲醇-10% 冰醋酸-45% 无离子水溶液染色 1~2 分钟, 在 90% 甲醇-2% 乙酸溶液中脱色到区带清晰。此时细胞结合的区域在苍蓝色的背景上显暗蓝色。图 5-6 系上述主要步骤所得结果。其中, 图 c~e 是从已染 NC 纸上取样, 用显微镜观察和摄影的显微照片。可见, 显区带的 c 和 e 处有大量细胞粘结, 而无区带的 d 处只有几个未洗净的细胞残留着。经用蛋白质分子量标准系列

检查(见图 5-6 左侧所列千道尔顿值), 和细胞结合的这两条区带, 分子量分别为 220,000 和 70,000 左右。经验证, 前者即纤连蛋白, 后者是血清的扩散因子(Spreading factor)。

显然, Hayman 等人的上述实验具有重大意义, 他们开创了用印渍术方便地从分子水平上得到细胞间相互作用的先例。回顾过去的常规方法, 为了鉴定细菌细胞或病毒感染正常细胞的分子基础, 必须设法先从正常细胞中逐个除去膜成分, 然后用病毒或细菌和此放空了某成份的细胞相结合。当发现此病毒不能再结合时, 则初步证明此物质是该病毒受体。在此基础上, 再把提纯了的这种物质插入到上述放空了此成分的细胞中, 再和病毒反应。如果病毒又能结合, 则证明此物质确系该病毒受体^[31, 32]。由上可知, 过去的实验方法难度极大。尤其是, 当病毒受体属嵌入膜的糖蛋白时, 由于提纯困难而难以实施。因而, 就病毒受体而言, 迄今为止已确证的仅数种。如磷酸酰丝氨酸已证明是疱疹性口炎病毒(Vesicular stomatitis virus)的受体^[33]; 尼克酰乙酰胆碱受体也可能是狂犬病毒(Rabies virus)的受体^[34]等。

为了说明印渍术用于鉴定病毒受体的优越性, 这里再举 Gershoni 等人最近用印渍术中的细胞印盖法, 鉴别出人红细胞膜的血型糖蛋白是副流感病毒受体这一例子^[30]。在前面点印渍一节中已经提及, 他们先用点印渍初探了实验条件, 在此基础上再用常规印渍术作了论证。具体做法是, 他们先把人红细胞影泡用 SDS-10% PAGE 分离, 电印渍于 NO 纸, 然后用 ¹²⁵I-标记或辣根过氧化物酶联副流感病毒进行印盖, 结果只显出一条区带, 和全谱对照此区带是含唾液酸的血型糖蛋白 A。据此, 他们提纯了血型糖蛋白 A, 并重复上述电泳-印渍-印盖诸步骤。结果, 所显区带位置和全膜制剂的实验结果完全一致。为了谨慎起见, 他们在印渍后又用唾液酸酶处理印渍纸。当降解除去唾液酸

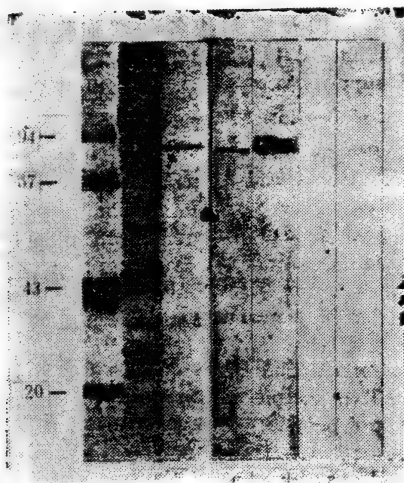


图5-7 副流感病毒和人红细胞膜成分的结合

左列为蛋白质分子量标准系列,数字以千道尔顿计。a、b,分别为红细胞膜及提纯的血型糖蛋白 A 凝胶的考马斯蓝染色谱;c、d,即 a 和 b 之印渍纸用病毒印盖之检出谱;e、f,即 c、d 印渍纸经唾液酸酶处理后再用病毒印盖之检出谱。

的糖蛋白区带并再和病毒印盖时,就不能检出了(详见图 5-7)。由此完全肯定,人红细胞膜上具有唾液酸末端糖链的血型糖蛋白 A 是副流感病毒的受体。唾液酸是否是该病毒识别所必须的?因为已知人红细胞膜上具有唾液酸末端糖链的,不只是血型糖蛋白 A。由此设想两种可能:一是其它唾液酸糖蛋白在膜中含量极少不能检出;二是由于病毒识别的结构除唾液酸外尚有其它部分。

Gershoni 等人根据上述实验结果指出,生物颗粒材料,如具外壳的动物病毒或重组病毒外壳,都可以充当蛋白质印渍术中印盖的探针。这种病毒印盖法,为筛选各种细胞和组织中潜在的病毒受体提供了一种简便有效的方法。也为检验不同群落

病毒间的结合作用, 以及它们和各种细胞膜多肽进行竞争性结合的研究, 提供了一种全新的方式^[30]。

三、印渍纸上原位修饰术

被印渍在固定化纸上的生物大分子, 可通过种种酶处理使之磷酸化、去糖链等。这即是印渍术中又一发展方向, Gershoni 和 Palade 称为印渍纸上原位修饰法^[35]。显然, 这种原位修饰将在生物分子相互作用中用来研究修饰物对此作用的功用。

上节所举 Gershoni 等人的病毒印盖点印渍实验中, 他们采用唾液酸酶来处理印渍了人红细胞膜蛋白质的印渍纸, 使印渍纸上含唾液酸的血型糖蛋白 A 失去唾液酸而不能和副流感病毒相结合^[30]。这种实验可作为印渍纸上原位修饰的实例之一。从中也不难领会到这种原位修饰的重要意义。

Dion 和 Poment 用蛋白酶处理印渍纸上的糖蛋白, 导致糖肽的迅速释放^[36]。他们的做法是, 先把鼠乳房肿瘤病毒 (Murine mammary tumor virus; 简称 MuMTV) 的糖蛋白 1.5 mg 溶于 0.5 ml PBS, 加入过碘酸钠到 2 mM, 于 0°C 下碘化 30 分钟。40,000 r/min 下离心取病毒沉淀物, 并悬浮于内含 (³H) NaBH₄ (10 mCi/ml) 的 0.5 ml PBS 中, 使之在室温下氟化 30 分钟。氟化毕, 加入未标记 NaBH₄ 到 1 mg/20 μ l 浓度, 继续在室温下保温 15 分钟, 以使反应完全。再如上述离心条件取病毒沉淀物, 并重悬浮于 0.1 ml PBS 中, 此即 ³H-标记 MuMTV 糖蛋白制剂。在 4 M 脲存在下对它进行板形 SDS-9% PAGE 分离。电泳后把凝胶一分为二, 一份直接进行放射自显影显现全谱 (图 5~8 A), 另一份用扩散作用双方向印渍于两张 NO 纸上。具体做法是, 把凝胶浸入内含 50 mM NaCl, 2 mM

EDTA, 0.1 mM DTT 和 4 M 脲的 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) 缓冲液中, 室温下反应 3 小时, 以便除去凝胶中的 SDS。取出凝胶夹于两张 NC 纸间, 并按常规法装配好夹层 (见第四章), 浸入 2 L 上述同种缓冲液中印渍 40~48 小时, 其间换新鲜缓冲液 1 次。按照凝胶放射自显影谱 (即图 5-8 A) 各区带位置, 分别剪下 NC 纸上相当于分子量为 55,000 和 34,000 的糖蛋白 (gp 55 和 gp 34) 区带, 分别放入试管。各加入 0.5 ml 内含 0.4% 链霉菌蛋白酶、10 mM CaCl_2 和 0.2 mM NaN_3 的 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液, 于 50°C 下进行酶解反应。反应期间, 每隔 4 小时各取一等分酶解液, 用液闪仪测定这种由 NC 纸上 gp 55 或 gp 34 因被蛋白酶解而释放于溶液的 ^3H -标记糖肽放射性。为了保持酶量, 反应进行到 12 和 24 小时处, 各补加 50 μl 内含链霉菌蛋白酶的同种酶解反应液 1 次。图 5-8B 即是所测结果。其中, (●) 为 gp 55 的酶解进程; (-) 为 gp 34 的酶解过程;

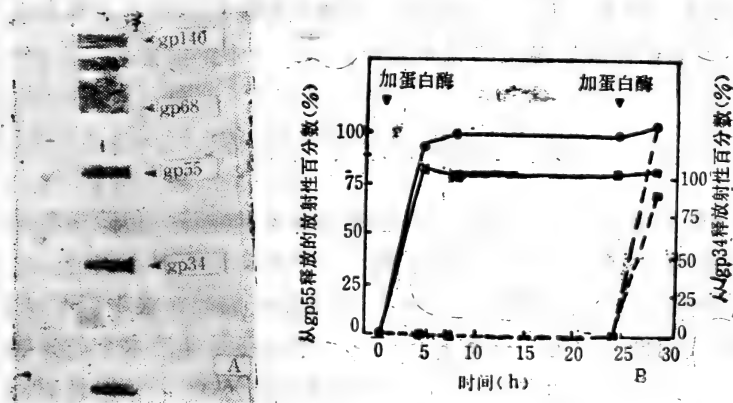


图 5-8 MuMTV 糖蛋白的凝胶分离放射自显影谱(A), 以及 gp55 和 gp34 区带经印渍后酶解而释放 ^3H -标记糖肽的动态进程图(B) (说明见正文)。

箭头示加酶处。可见酶解 4 小时后,无论是 gp 55 还是 gp 34,都已释放了大于 90% 的糖肽。同条件下不加酶的对照,无放射性释放入溶液。此实验充分证明,糖蛋白被牢固地固定于 NO 纸上,可用蛋白酶对 NO 纸进行有效的原位修饰。就本实验条件而言,4 小时即可完成反应。Dion 和 Pomenti 认为,这种印渍纸上原位酶解方法可用于糖蛋白所含糖链的糖残基序列分析,此时只需用各种外切或内切糖苷酶消化印渍物,然后分析所释放的糖残基即可^[36]。

有关印渍纸上被印渍的磷酸化蛋白质,通过碱性磷酸酶原位处理使之去磷酸的工作也已开始^[35]。可以相信,印渍物的原位修饰必是印渍术发展的主要方向之一。因为,印渍使得生物分子固定化,使生物分子具有相当好的稳定性,经得起种种处理,也经得起原位修饰。事实上,在印渍纸上进行 ^{125}I -标记^[17]、进行分子杂交^[37]、进行免疫检出^[12]等,都可视为印渍纸上生物分子的原位修饰。由此也可设想,印渍纸的原位修饰必能顺利发展,并不存在难以逾越的技术障碍。

四、生物小分子印渍术

虽说生物大分子印渍术是当代印渍术的主流,但除核酸与蛋白质两大类物质外,其它生物小分子的印渍也时有报道。它们的印渍方式有时偏离常规方法,种类也还局限在很小范围,但却给我们许多启迪。据此暇想出它们很可能是印渍术今后发展的又一方向,并可能在工业(如味精制造业)中得到应用而值得重视。

需要说明的是,有些报道冠以“配体印渍术 (Ligand blotting)”的名称^[38],配体一词习惯上常把它视为酶的底物、竞

争抑制剂等之类的小分子化合物^[39]。其实在生物化学中,配体系指生物分子亲和偶中一方而言,当甲方被固定于柱(如琼脂糖柱)或纸(如 NC 纸),则乙方被称为配体;反之,乙方被固定时,甲方也转称为配体。配体既可是小分子,也可以是大分子,必须视报道内容来了解。例如 Cardin 等人所述配体印渍术,实际上是用 ¹²⁵I-肝素(粘多糖,属大分子)作为探针,检出印渍纸上人血浆乳糜粒的低密度脂蛋白^[38]。按类(见第一章),它应属蛋白质印渍术。其目的,在于探讨人血浆中可和肝素(这里由它为配体)结合的蛋白质,故不属生物小分子印渍术的范畴。

1985 年, Thompson 等人提出了一种他们称为“产物选择性印渍术(Product-selective blotting)”的小分子印渍术^[9]。他们把谷酰胺溶液浸透的滤纸,覆盖在经电泳分离、内含谷酰胺酶的琼脂凝胶上。凝胶下,放一块含有离子交换树脂的凝胶作为印渍胶,利用其下干的普通滤纸的吸水作用,把最上层滤纸中的谷酰胺吸入含谷酰胺酶的凝胶中,使之发生酶促反应。所产生的产物——谷氨酸和未反应完的底物——谷酰胺,仍因最下层干滤纸的吸引而被迁入印渍胶中(参见图 3-4)。由于印渍胶中含有离子交换树脂,其条件又控制在只和谷氨酸发生交换的最适条件下进行。因此这种印渍的结果,使得只有谷氨酸被固定,其它物质,包括谷酰胺、谷酰胺酶及样品中其它成分,或穿透印渍胶而流失,或在印渍后的洗涤步骤中被除去。最后所得谷氨酸印渍胶用酚酞试剂染色 10~30 分钟(有关谷氨酸酚酞染色可参看文献[40]),然后在长波紫外光下拍摄荧光谱,再用密度计于 465 nm 波长下扫描定量。Thompson 等人曾对提纯的谷酰胺酶用一系列浓度进行平行实验,又在同块凝胶上直接点上一系列浓度的谷氨酸,经染色和定量扫描,绘制出标准曲线。图 5-9 即是实验结果。图中,上排斑点是直接点样的谷氨酸标准品,自左

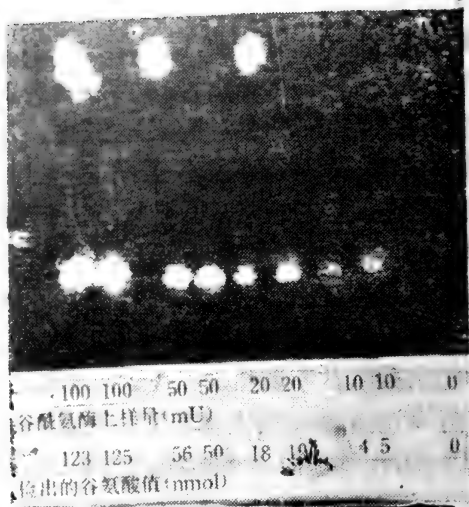


图 5.9 不同浓度谷酰胺酶反应所得谷氨酸印渍谱(说明见正文)

向右浓度分别为: 200、100 和 50 nmol。下排是谷酰胺酶反应后所得谷氨酸印渍谱。图下数字注明了上样的酶单位(相邻两斑点为一组)和所测谷氨酸量。可见二者呈线性关系^[9]。此外, Thompson 等人也曾用此法和常规放射性测定法作了比较, 结果如表 5-1 所示, 可见二者结果相似, 说明此法可和常规放射性测定法媲美。Thompson 等人认为, 这种印渍法具有广泛用途, 不限于检出谷酰胺酶和谷氨酸合成酶的活性和检出谷氨酸量。印渍所用固定化材料也不限于离子交换树脂, 例如连有各种配体的琼脂糖凝胶之类, 也能起到选择性吸附的作用。此外他们还认为检出小分子的选择性可通过改变印渍条件来获得。如改变 pH、离子强度和竞争性底物等^[9]。

脂多糖(LPS)构成了革兰氏阴性菌体细胞的(O)抗原, 它大多由 20 个左右的糖残基连于一分子类脂所组成。也可算是生物小分子类化合物。Bradbury 等人在研究革兰氏阴性菌的

表 5-1 谷氨酸印渍法与常规放射性测定法比较

上样的谷酰胺酶活力单位 (mU)	反应时间 (min)	检出的谷氨酸 (nmol)	
		印渍法	常规法
80	10	856	813
40	10	316	444
40	20	705	未测
40	10	471	444
40	5	105	未测

LPS 抗原特性中采用了印渍术,并称之为 LPS 印渍术^[6]。由于这是除核酸和蛋白质外的又一种重要的生物分子的印渍报道,这里将较详细地介绍如下;

Bradbury 等人实验所用材料为大肠杆菌 (*E. coli* 0:111:B4)、奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis* 0:3; 简称 P. mir0:3) 和普罗维登斯杆菌 (*Providencia stuartii* 0:4; 简称 P. stu 0:4)。他们一方面用这些细菌悬液分别注射白兔,获取各自的抗血清,另一方面用它们制备各自的 LPS。在提纯 LPS 时,他们把 50 个培养皿的培养细菌,以每培养皿 3ml 的体积悬浮于 0.85% 生理盐水中。经离心、洗涤和再离心后,取细胞沉淀物称重,并转入 45% 酚溶液。冰浴下充分混合 5 分钟,加热到 65°C,再搅拌 10 分钟。冰浴冷却到 4°C, 1,000 g 下离心 30 分钟,除去上层酚相溶液。下层溶液对流动的自来水透析 48~72 小时,透析袋内即是 LPS。冰冻干燥后贮于干燥器备用。

LPS 的电泳分离是用 14% PAGE 完成的。电泳共作 4 套,其中一块电泳凝胶进行银染色,另三块分别用三种菌株的抗血清进行转移后的免疫印盖。此间,先把凝胶作模板,于 60 V 下电印渍于 NC 纸。所用印渍缓冲液和常规印渍并无两样,即 20mM Tris-HCl-150 mM 甘氨酸和 20% 甲醇。印渍后,每张

NC 纸浸于 200 ml, 内含 0.9% NaCl, 0.25% 白明胶的 10mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液中, 于 40°C 下猝灭 1 小时。把 NC 纸分别转入 100 ml, 内含 1:400 稀释度的各菌株的兔抗血清和 0.25% 白明胶的 10mM Tris-HCl (pH 7.4) I 抗反应液中, 搅动下反应 16 小时。取出 NC 纸, 用内含 0.9% NaCl 的 10mM Tris-HCl (pH 7.4) 洗两次, 共 1 小时。再用内含 0.05% Nonidet P40 和 0.9% NaCl 的 10mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液洗两次, 共 1 小时。把 NC 纸转入含有 5×10^5 opm/ml ^{125}I -A 蛋白-羊抗兔 IgG 和 0.25% 白明胶的 10mM Tris-HCl (pH 7.4) II 抗反应液中, 反应 1.5 小时。反应完成后, 如 I 抗反应的洗涤步骤彻底清洗, 把 NC 纸干燥后进行放射自显影。

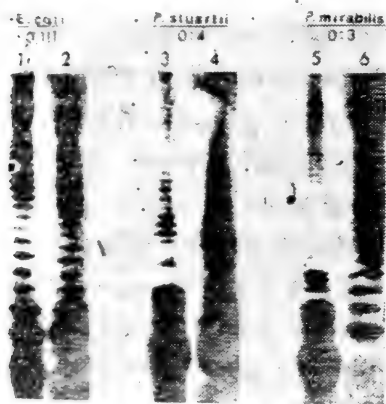


图 5-10 三种革兰氏阴性菌株的 LPS 印渍谱(说明见正文)

图 5-10 是革兰氏阴性菌的 LPS 印渍谱。其中 1、3 和 5 列是各菌株 LPS 经电泳分离后, 凝胶直接用银染料染色的对照谱; 2、4 和 6 列则是各菌株 LPS 凝胶经印渍, 并用各自抗血清免疫印盖所得 ^{125}I -放射自显影谱。由于已知脂多糖系由外层专一性低聚糖链、中心多糖链和脂质三部分组成, 且近代已知属中心多糖链的部分

在电泳中迁移最快, 而含 O 抗原的外层 LPS 迁移居中^[41], 故不难从图 5~10 分辨出。用 *E. coli* 0:111 和 *P. mir* 0:3 抗血清印盖的 LPS 印渍谱中(即 2 和 6 列), 二者所含抗体主要是针对含 O 抗原的外层 LPS 的。它们和中心多糖链部分的反应较

差,尤其是 *P. mir*0:3(6列)。和它俩不同, *P. stu*0:4 的抗血清中则既含针对外层, 也含针对中心部分 LPS 的抗体(4列)^[6]。

Bradbury 等人的上述工作,开创了印渍脂多糖的先例,为印渍术的应用增添了又一方向。值得提出的是,Bradbury 等人一方面同意 Gershoni 和 Plade 的建议^[35],避免使用如东部印渍术之类的地区性术语来称呼印渍术,故采用了“LPS 印渍术”这一正确名称。但是,他们却同时又提议,是否把东部印渍术(Eastern blotting)改用在非蛋白质和核酸类的生物分子印渍术上,而把西部印渍术(Western blotting)一词从免疫印渍扩大到蛋白质和结合蛋白质(即糖蛋白、脂蛋白等)^[6]。显然这是不能同意的,因为 Gershoni 和 Palade 关于取消地区性命名法的目的,不只是为了纠正西部印渍术和东部印渍术都指蛋白质印渍术的这一重迭而引起的混乱,更主要的是防止这类地区性名称延续下去,将不可避免地会出现如像“中东印渍术(Mid-Eastern blotting)”之类,会引起不必要政治纠纷的名称之缘故^[35]。

五、测定酶活性的酶印渍术

近年来已有几项用印渍术测定酶活性的实例。前节所提 Thompson 等人的产物选择性印渍术,测定了玉米苗叶所含谷氨酸合成酶的活力^[9],它可算是这方面的实例之一。如果认为 Thompson 等人的印渍方法已偏离常规印渍术还难以令人信服的话,那末下面所举 Ohlsson 等人的例子则是完全按标准印渍方法来测酶活性的。他们不仅测定了几种蛋白酶的活性,还测定了酶原^[42]。

Ohlsson 等人称他们的方法为酶印渍术(Enzymoblott-

ing), 目的在于开发一种特异性检出生物体液和组织抽提液中蛋白酶类及其酶原的方法^[42]。为了说明他们这种酶印渍法的实用性, 他们除试验了市售猪的胰蛋白酶(EC 3.4.21.4)、猪的弹性蛋白酶(EC 3.4.22.11)和牛的胰凝乳蛋白酶(EC 3.4.21.1)外, 还试验了猪胰匀浆物中这些蛋白酶及其酶原。具体做法是, 猪胰组织绞碎后加入4倍体积预冷到2°C的0.05 M CaCl_2 -0.2 M Tris-HCl(pH 8.3)溶液, 在一支玻璃/特氟隆匀浆器中匀成浆状, 4°C, 30,000 g 下离心1小时, 上清即是待测猪胰匀浆液。为了试验蛋白酶原, 部分匀浆液在电泳前加1/4体积的、用生理盐水配制成1mg/ml的肠肽酶或胰蛋白酶, 并在37°C下保温30分钟, 以使匀浆液中蛋白酶原活化。

上述各种蛋白酶样品, 分别以10 μl 上样量进行1%琼脂糖凝胶电泳, 电泳严格控制在10~12°C、6 V/cm电压梯度下进行30分钟, 以保证酶不失活。电泳结束, 各板形凝胶一分为二, 一份直接用银染料染色作全谱显现, 另一份用毛细作用印渍法印渍于NC纸。因是大孔琼脂糖胶为模板, 印渍只需30分钟。印渍后取下NC纸进行空气干燥。为了试验印渍纸上原位检出蛋白酶原的可能性, 在上述印渍前, NC纸先用浓度为1.0或0.1mg/ml, 用0.05 M CaCl_2 -0.2 M Tris-HCl(pH 7.8)缓冲液配制的肠肽酶或胰蛋白酶, 在室温下预保温1小时。

印渍并干燥了的NC纸分别在各蛋白酶的对硝基酰替苯胺底物溶液中保温1小时, 以进行原位酶反应。此时, 检出胰蛋白酶的底物是N- α -苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基酰替苯胺盐酸盐(简称Bz-Arg-pNA), 用时取25mg于95°C下溶于50ml, 0.2 M Tris-HCl(pH 7.8)的缓冲液中。对胰凝乳蛋白酶而言, 底物是琥珀酰-L-苯丙氨酸-对硝基酰替苯胺(Suc-Phe-pNA), 用时取25mg溶于2ml二甲亚砜中。此底物也可用N-苯甲酰-L-酪

氨酸-对硝基酰替苯胺 (Bz-Tyr-pNA) 替代, 用时也取 25 mg, 但溶于 12 ml 二甲亚砜中。检出弹性蛋白酶的底物是 *N*-琥珀酰-L-丙氨酸-L-丙氨酸-L-丙氨酸-对硝基酰替苯胺 (Suc-(Ala)₃-pNA), 用时取 25 mg 溶于 10 ml 二甲亚砜中。

上述蛋白酶解反应产生的对硝基苯胺, 可用 *N*-(1-萘基) 乙二胺使之重氮化而产生红色偶氮染料。为此, 把上述已和底物反应的 NC 纸放入内含 0.1% 亚硝酸钠的 1M HCl 中反应 5 分钟, 再转入内含 0.5% 氨基磺酸铵的 1M HCl 中反应 5 分钟, 最后转入内含 0.05% *N*-(1-萘基) 乙二胺的 47.5% 乙醇溶液中。当 NC 纸上显出红色区带, 且达最大强度时 (通常在 1~5 分钟后) 才取出 NC 纸, 并直接封入两张透明塑料纸之间。装配时切勿有气泡, 把四周粘封后贮于 -18°C。

由上操作可见, Ohlsson 等人是把有活性的蛋白酶印渍于 NC 纸, 再用特异性底物与之原位反应而检出, 因此称为酶印渍术是有根据的, 确是始终保持着酶活性。他们的这一实验得到了两项颇有价值的结果:

(1) 关于活性蛋白酶的

检出 当用 Bz-Arg-pNA 检出胰蛋白酶时, 有四条迁向阳极的区带显现 (图 5-11 和 5-12A)。图 5-11 还出示了上样 50、10、5、1、0.5 和 0.1 μ g (自左向右) 市售胰蛋白酶所显酶印渍谱, 由此证明此法最小检出值为 0.5 μ g 酶量。用各种特异性底物, 以酶印渍法检测胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶, 以及它们的酶原的印渍谱如图 5-12 所示。就胰凝乳蛋白酶而言, 不论用何底

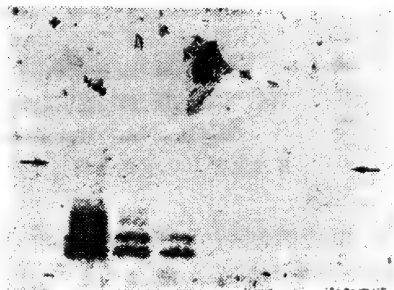


图 5-11 用酶印渍术测定胰蛋白酶活性的印渍谱 (说明见正文)

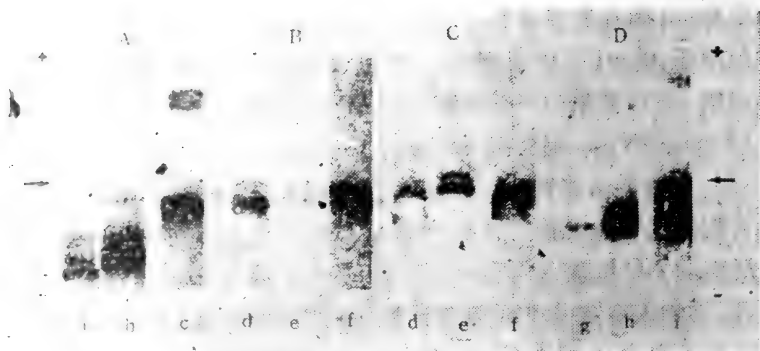


图 5-12 用酶印渍术测定三种蛋白酶活性及其酶原的印渍谱
A, 以 Bz-Arg-pNA 为底物测胰蛋白酶活性(a, b)和其酶原。其中, a 为上样 10 μg 的市售胰蛋白酶制剂; b 为用肠肽酶活化过的猪胰匀浆物; c 为胰匀浆物经电泳后印渍入含肠肽酶的 NC 纸上, 所显现的酶原活化谱。
B 和 C, 系分别以 Bz-Tyr-pNA 和 Suc-Phe-pNA 为底物, 测定胰凝乳蛋白酶活性(d, e)及其酶原(f)。其中, d 为上样 100 μg 的市售胰凝乳蛋白酶商品; e 为用胰蛋白酶活化过的猪胰匀浆物; f 为胰匀浆物电泳后印渍于含胰蛋白酶的 NC 上, 所显现的酶原活化谱。
D, 以 Suc-(Ala)₃-pNA 为底物测弹性蛋白酶活性(g, h) 和其酶原(i)。其中, g 为上样 100 μg 的市售弹性蛋白酶商品; h 和 i 的处理分别和 e, f 相同。

物, 市售酶制剂(图 5-12 Bd 和 Cd)和用肠肽酶活化了酶原的猪胰匀浆物(图 5-12 Be 和 Ce), 都在阴极区显出两条较弱的区带。经一系列酶浓度印渍比较, 检出限度是 5 μg (用 Bz-Tyr-pNA 为底物) 和 10 μg (用 Suc-Phe-pNA 为底物)。弹性蛋白酶活性印渍时, 也在阴极区显现两条区带(图 5-12 Dg), 检出限度为 5 μg 。但用胰蛋白酶活化过的猪胰匀浆液的印渍谱上, 还在阳极区显现一条弱的区带(图 5-12 Dh)。

(2) 关于酶原的原位检出 当从猪胰匀浆液电泳分离出蛋白酶原, 并印渍于 NC 纸时, 使用任何底物都不能检出任何区带。但用肠肽酶或胰蛋白酶预处理 NC 纸, 再进行同种印渍时, 酶

原则因进入 NC 纸而被纸上存在的肠肽酶或胰蛋白酶原位活化,致使区带显现。由于酶原比其相应的蛋白酶分子量大,因此这种原位活化的酶原所显现的区带数和迁移率都和其相应的蛋白酶不一样(试比较图 5-12 各列)。

Ohlsson 等人也研究过这种酶印渍的印渍效率,证明 0.1~10 μg 之间的 OT 上样量,几乎能达到 100% 的印渍效率。超过 10 μg 就难以完全印渍。在酶原原位活化中,NC 纸用肠肽酶预保温的浓度也有影响。当使用 1~10 mg/ml 浓度时,用 Bz-Arg-pNA 作底物可得三条区带。若肠肽酶浓度降为 0.1 mg/ml 或更低时,使用同种底物也只能在阴极处显现一条区带。又证明,印渍有蛋白酶的干 NC 纸虽经在 4°C 和 25°C 下贮藏 66 天,仍能得到与未贮藏的相同结果。如果把经酶活性染色了的印渍纸,放入密封塑料袋中贮于 -18°C 下,虽经 16 个月,酶反应的区带强度或分辨率都不会发生变化^[42]。但若湿放室温或 4°C 时,在几天内区带就逐渐变弱并最后消失。此外,Ohlsson 等人也指出,样品中不需要很高的酶活性,因为印渍后酶处于 NC 纸表面,易和底物接近而反应。酶促反应的产物又被结合于 NC 纸上,因此增大了灵敏度和分辨率。相反,如果酶活性过高,就可能产生多于 NC 纸结合容量的产物,致使这些多出来的产物进入底物溶液中使之成为黄色,结果会在重氮化后使 NC 纸出现微红色背景,区带则变为暗红色^[42]。Ohlsson 等人预言,这种酶印渍适用于一切其底物可用 β -硝基酰替苯胺基团修饰的酶类。用其它生色团修饰的底物,如 β -萘酚基团修饰的底物,也可能采用酶印渍术检出其活性^[42]。

其实,Reinhart 和 Malamud 早在 1982 年就曾报道过用扩散印渍法印渍天然酶来检出其活性,只是由于扩散印渍需长时间,酶活性有所下降而效果不够理想^[43]。次年,Sloup 和

Gerbling 把扩散印渍改为电印渍, 不但成功地检出了菠菜叶和豌豆叶中的淀粉酶活性, 而且还能用这种酶印渍术分析淀粉酶的多态型^[44]。由于 Slep 和 Gerbling 这一酶印渍中采用的不是常规印渍用纸, 而是聚丙烯酰胺凝胶, 因此作为印渍术中所用固定化材料的又一范例, 值得作较详细的介绍。

Slep 和 Gerbling 的酶印渍采用菠菜 (*Spinacia oleracea*) 和豌豆 (*Pisum sativum*) 叶粗提液为材料, 以 $120\text{ }\mu\text{g}$ 每穴蛋白质含量的上样量, 进行板形 8.5% PAGE。为了和原有用亲和电泳分析淀粉酶多态型的技术相比较, 有些凝胶中掺入了直链淀粉。电泳结束后把凝胶取出, 放在另一块内含 0.1% 直链淀粉的板形 8.5% PAG 之左侧, 再用两张已用印渍缓冲液 (37.4 mM Tris - 288 mM 甘氨酸 pH 8.6) 浸湿的普通滤纸间, 其外则如常规电印渍那样, 用泡沫塑料和多孔有机玻璃板夹持。把装配件放入电印渍槽, 在 350~470 V (20~13 mA) 下电印渍 5 小时。一种简化了的示意图如图 5-13A, 两电极距离为 7 cm, F 表示普通滤纸, S 是用作印渍模板的凝胶, A 为内含直链淀粉的印渍凝胶。为了和扩散印渍法^[43]相比较, 有些作为模板的凝胶进行了扩散印渍。此时印渍液采用 5 mM CaCl_2 -50 mM Mes (pH 6.6) 缓冲液, 扩散印渍系在室温下进行 24 小时。印渍完成后, 模板凝胶和未印渍的电泳凝胶均用考马斯蓝 G-250 染色。印渍凝胶则用碘处理进行负染色。此时, 把印渍凝胶用水洗两次, 放入 10 mM KI-14 mM I_2 溶液中直到深蓝色背景上出现无色区带为止。此染色凝胶可保存于 30% 甲醇-5% 乙酸溶液中。

上述实验结果示于图 5-13B, 图中 I~III 号凝胶都是用碘化物进行淀粉酶特异性活性染色法。胶 I 未印渍, 实为电泳分离胶, 因未发生任何酶反应, 用碘染色时就不能显现任何区带。由此对照也反映出实验未产生任何污染。胶 II 相当于过去检

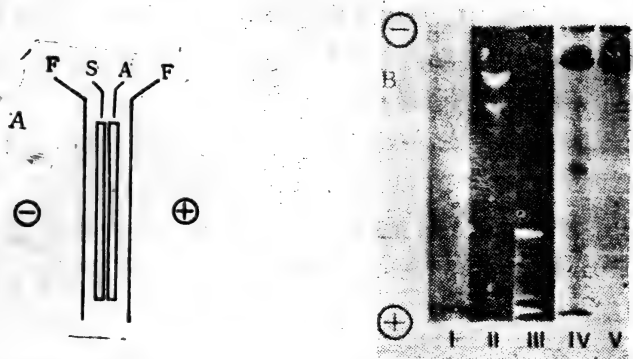


图 5-13 淀粉酶印渍装置(A)及其多态型分析印渍谱(B)(说明见正文)

出淀粉酶活性时所用亲和电泳法,也即在电泳前,凝胶中预先掺入了直链淀粉。当把菠菜叶粗提液上样于这种凝胶并电泳时,由于所含淀粉酶在电场中迁移的同时发生着酶促反应,因此胶 II 虽未经印渍,用碘也能染色。从胶 II 图谱看,区带呈弯月形,这充分反映出淀粉酶在迁移过程中发生酶反应的情景。显然,亲和电泳过程中,由于发生着底物-酶相互作用,致使酶的电泳迁移率改变,分辨率也下降了(区带数不多)。关于迁移率的变化不难用标准品予以修正,但分辨率下降则难以挽救,使成为亲和电泳技术的限制因素。胶 III 是菠菜叶粗提液经电泳分离、电印渍于含有直链淀粉的凝胶,再用特异性淀粉酶活性碘染色之检出谱。可见,至少有10条代表各种类型淀粉酶的区带密集于阳极区。其迁移率和亲和电泳显现的区带大不相同,区带数也多(请比较胶 II 和 III),说明酶印渍具高分辨率。但是,胶 III 若改用扩散印渍法,则无区带显现(图谱未示),这可能是由于长时间印渍(24 小时)使酶失活,或只有少量酶被转移的缘故。胶 IV 和 V 分别是胶 III 印渍前和后所用印渍模板凝胶的考马斯亮蓝染色谱。它们都未能在相当于淀粉酶多态型各区带位置处显现

区带。对此,胶 V 可看成是因区带全部转移于印渍胶之结果,胶 IV 则只能解释为考马斯亮蓝的检出灵敏度较差,这也反证了酶印渍术的高灵敏度。

Steup 和 Gerbling 在进行上述实验的同时,还调查了淀粉酶印渍中,印渍时间和印渍效率的关系。正如图 5-14 所示,只有在印渍 60 分钟时才能得到 5 种酶型组成的淀粉酶全谱(图 5-14B 之胶 IV),过短或过长的印渍时间都将导致部分酶型的丧失。

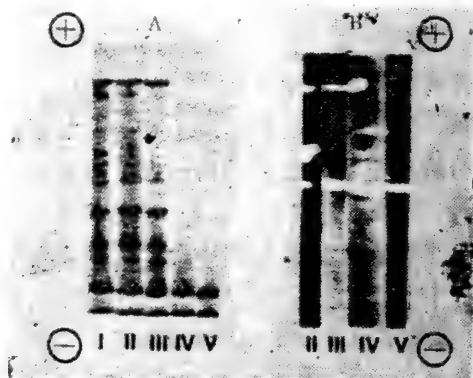


图 5-14 含淀粉酶活性的碗豆叶粗提液经电泳分离并印渍后,印渍模板的考马斯亮蓝染色谱(A)和印渍胶的淀粉酶特异性碘染色谱

胶 I-V 分别为电印渍 0、10、30、60 和 120 分钟。

由上诸例清楚表明,酶印渍术是十分灵敏而简便易行的方法,用它研究酶的多态型、检出同工酶、定量测定酶活性等都具有很大潜力。这在酶制剂工业生产的产品检验、临床酶法诊断、生化酶制剂药物的药检等应用部门中,可能发挥重要作用。需要指出的是,酶印渍术应专指印渍后仍具酶活性,并能通过原位酶反应而检出一类印渍术。至于那些印渍后已无酶活性,靠蛋白质

常规染色剂予以定位的方法,还是归入蛋白质印渍术为好。

六、印渍物的回收技术

常规凝胶电泳分离的生物大分子,可以通过扩散作用或电洗脱予以回收,从而达到制备生物大分子的目的。对凝胶上已分离区带进行切片并匀浆,是回收生物分子最常用的办法。但它的洗脱回收效率较差,尤其是分子量大的蛋白质。人们也采用可逆性交联剂来铸胶,以便电泳后用化学试剂使凝胶解聚,提高蛋白质的洗脱效率^[45]。但解聚剂又常使蛋白质修饰或降解。近代也确实创造出一些极好的,用电洗脱的方式从凝胶中回收蛋白质的方法^[37, 47]。它们虽说能有效地回收生物大分子,但需要结构复杂的装置和熟练的操作技巧^[48]。

印渍术使生物大分子处于薄的印渍纸上,如果生物大分子和印渍纸是非共价结合(如采用 NC 纸、ZB 膜等),理应比从凝胶中回收生物大分子要容易并有效得多。因此从印渍纸上回收蛋白质等,必是印渍术的又一发展方向。

1985 年, Parekh 等人对从 NC 纸上洗脱蛋白质作了详细研究,取得了许多值得重视的结果^[5]。他们把市售蛋白质分子量标准系列用氯胺 T (Chloramine-T) 法^[49]使之 ^{125}I -标记,然后用 SDS-10% PAGE 分离,再用 Burnette 法印渍于 NC 纸^[50]。图 5-15 即是他们得到的, NC 纸上 ^{125}I -标记蛋白质标准品的放射自显影谱。左列数字为分子量(千道尔顿),从上到下分别是磷酸化酶 b, 牛血清白蛋白, 卵清蛋白, 碳酸酐酶和大豆胰蛋白酶抑制剂。由图可见,除 67 kDa 和 43 kDa 之间有杂蛋白外,各区带迁移率相差很大,适于定量分析。

为了研究制备回收图 5-15 所示各蛋白质的最佳洗脱条件,

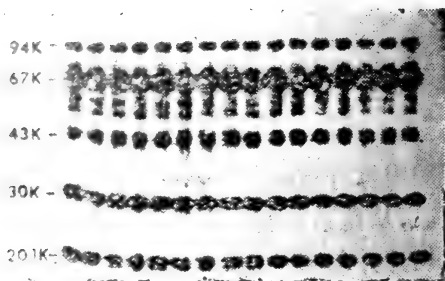


图 5-15 印渍于 NC 纸上 ^{125}I -标记蛋白质分子量标准系列的放射自显影谱(说明见正文)

Parekh 等人把此 NC 纸按列纵切成条, 以便用于各种条件试验。每一条上的区带仔细切下, 分别放入伽玛计数器中测放射性, 然后再按表 5-2 所示洗脱剂、保温温度和时间, 分别洗脱。此时每平方厘米 NC 纸采用 0.3ml 洗脱剂, 每样重复 3 次。洗脱后取走 NC 纸, 溶液在 10,000g 下离心 5 分钟以除去任何不溶物。分别测 NC 纸和离心上清液之放射性, 并计算洗脱效率(%)。

从表 5-2 所列结果清楚表明: (1) 含有 1% 去污剂 (SDS, DOC Triton X-100) 或氢键解裂剂 (3M 盐酸胍或 6M 脲) 的 pH 8.9 乙酸铵缓冲液 (A-A), 在 100°C 下洗脱 5 分钟, 其洗脱效率通常仅在 5~10% 左右 (见 1-4 号处理), 虽说低分子量的大豆胰蛋白酶抑制剂的洗脱效率, 在 1% SDS 中处理时效果较好些。(2) 把各种去污剂组合起来于 100°C 下洗脱 5 分钟 (6号), 各蛋白质的洗脱效率在 25~85% 范围内, 随分子量的增加洗脱效率下降。显然, 这种处理是比较有效的, 但所得蛋白质应是变性了的。(3) 用含有有机溶剂 (乙腈或吡啶) 的乙酸铵缓冲液, 于 60°C 下洗脱 3 小时, 取得了最佳洗脱效率 (7 和 8 号), 各分子量蛋白质的洗脱效率上升到 60~90% 范围内。较低分子

表 5-2 各种溶剂系统洗脱 NC 纸上印渍的蛋白质分子量大标准的洗脱效率

处理号	洗脱溶液组成	洗脱温度与时间	洗脱效率(%)				
			大豆胰蛋白酶抑制剂 (20.1KDa)	碳酸酐酶 (30KDa)	卵清蛋白 (43 KDa)	牛血清白蛋白 (67KDa)	磷酸化酶b (94 KDa)
1	0.1MA-A (pH8.9)	100°C, 5 min	8.7	5.0	2.7	1.2	1.0
2	1% Triton X-100 (或 DOC) - 0.1 MA-A (pH8.9)*	100°C, 5 min	10.2	7.5	5.5	3.0	2.5
3	6 M 脲 (或 3 M 盐酸胍) - 0.1 M A-A (pH8.9)	100°C, 5 min	13.7	10.0	10.0	5.2	4.2
4	1% SDS - 0.1MA-A (pH8.9)	100°C, 5 min	72.5	23.7	22.5	18.0	7.5
5	50% 甲酸溶液	60 或 100°C, 3h	91.2	75.5	45.0	57.5	37.5
6	0.1 % SDS - 0.5% DOC - 0.5% Triton X-100 - 0.1MA-A (pH8.9)	100°C, 5 min	82.5	78.7	75.0	70.0	26.2
7	40% 乙醇 - 0.1 M A-A (pH8.9)	60°C, 3h	96.2	85.5	87.5	76.2	57.5
8	50% 吡啶 - 0.1 MA-A (pH8.9)	60°C, 3h	97.5	90.0	81.2	85.5	60.0

* A-A, 乙酸铵缓冲液 DOC, 脱氧胆酸钠。

量者几近 100%。单用甲酸于 60°C 下洗脱 3 小时得到了中间产率,即在 35~75% 范围内(5 号)。(4)除少数例外,通常分子量越大洗脱效率越差。从上述结果可以得出这样的结论,有机溶剂具有最好的洗脱效率,说明蛋白质和 NC 纸是以疏水力结合为主。分子量越大越难洗脱,说明蛋白质和 NC 纸是多点结合。即分子量越大结合位点越多,洗脱也越困难^[5]。Parekh 等人认为,回收的蛋白质中所含吡啶和乙腈可以通过把蛋白质冰冻干燥来除去。此外,SDS-PAGE 因对分离复杂的蛋白质混合物具有高分辨率而被广泛采用,SDS 的存在将干扰蛋白质进一步的生化分析,采用挥发性溶剂洗脱 SDS-蛋白质复合物有利于使 SDS 从蛋白质中分离出来而除去。

为了进一步了解用有机溶剂制备回收 NC 纸上蛋白质的最佳条件,Parekh 等人又作了洗脱温度 and 时间的系列实验,结果如图 5-16 所示。事实上,洗脱温度越接近所用有机溶剂的沸点则洗脱效率越高,但这是制备蛋白质所不能容许的。从图 5-16 A 所示结果看,在 37°C 和 60°C 下洗脱有着同等的效率,若在

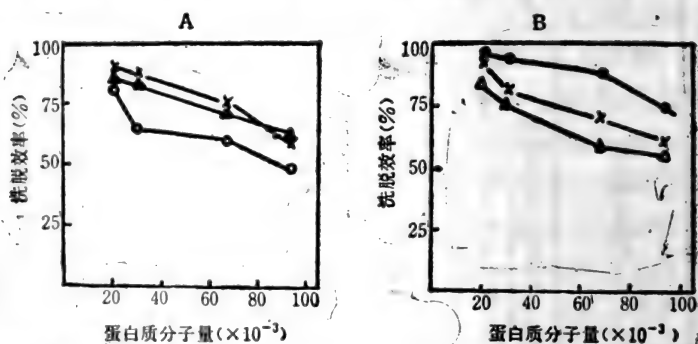


图 5-16 用 50% 吡啶-0.1MA-A(pH 8.9)洗脱 NC 纸上蛋白质分子量标准系列时洗脱温度(A)和时间(B)的影响

A: 中 ○, 5°C; △, 37°C; ×, 60°C。B 中: △, 1h; ×, 3h; ●, 12h(均在 37°C 下)。

5°C 下洗脱, 则是它们的 80~85% 左右。用 40% 乙腈作类似实验也得类似结果。从洗脱时间看, 若以 24 小时处的洗脱效率为 100%, 那末洗脱 1 小时则为其 70~90%, 洗脱 3 小时则为其 80~100% (图 5-16B), 因此使用这些有机溶剂洗脱蛋白质时, 以 37°C 下保温 3 小时为佳^[5]。

七、在印渍纸上使用非放射性 探针的分子杂交术

八十年代初, 核酸分子杂交技术中出现了多种使用非放射性探针进行原位分子杂交的方法。如所周知, 研究核酸所用方法, 因要求有较高灵敏度而离不开使用放射性同位素。就最常使用的 ³²P 来说, 其半衰期仅 14~15 天, 属不稳定同位素, 操作者也难免不受其辐射。因此人们一直在寻求非放射性核酸探针。

Langer 等人^[51]于 1981 年首先采用 Bio11-dUTP 作为掺入物, 用它进行 DNA 的切口移位标记获得成功。两年后, Leary 等人^[52]改进了它的显色反应系统, 并使这种检测商品化。他们的作法是, 把生物素标记的探针与印渍在 NO 纸上的靶 DNA 杂交, 再用链球菌抗生物素蛋白 (SA) 及生物素联酶多聚体 (Poly AP) 保温, 加入染料底物后, 靶 DNA 序列即呈蓝色的斑点或区带显现出来。其后一系列生物素标的寡核苷酸探针相继问世, 其中最引人注目的则是 Forster 等人^[53]合成的光化生物素, 它很有希望大大提高现行非放射性标记和检测技术的灵敏度。

最近, 荧光技术也闯入了 DNA 的双脱氧测序法。Smith 等人已成功地修饰了双脱氧法所需的寡核苷酸引物, 形成特强的荧光衍生物^[54]。这些方法都因避免了放射性污染而受到重

视^[57, 50]。这里将以 Hopman 等人最近创立的汞化核酸探针 (Mercurated nucleic acid probe) 为例^[57~50], 来说明这类非放射性探针的制备和用于分子杂交的原理。

几乎所有这类用于核酸分子杂交的非放射性探针, 都是采用化学法或酶促合成法把半抗原 (例如二硝基苯、生物素、荧光素、乙酰胺基荧光素) 连接于核酸分子, 然后采用酶联免疫化学技术予以酶活染色或荧光谱来显现区带。Hopman 等人的汞化核酸探针也属此类^[59], 只是用汞把核酸和含有巯基的半抗原桥接在一起。他们认为这样做要比其它方法结合更牢固, 用于分子杂交时更稳定, 这类修饰作用不会影响分子杂交的性质等等。

Hopman 等人首先按图 5-17 合成含巯基的半抗原。图中, 缩写符号所代表的化合物名称是: Fmoc 为甲氧基羰基荧光素基团; Boc 为丁氧羰基; OPfp 为五氟苯酯; DMA 为二甲胺; sAhx 为 6-氨基己酸; Tnp-SO₃H 为三硝基苯磺酸; BiO-ONSu 为 1-琥珀酰亚胺基生物素酯; Flu-NCS 为荧光素异硫氰酸盐; TFA 为三氟乙酸; DTT 为二硫苏糖醇。图中数字为各反应物之编号, 中央竖线和最后一行的虚线表示为: 若 6 号化合物和 Tnp-SO₃H 反应则得 9 号化合物, 即 Tnp-Lys-Lys-NH-(CH₂)₂-SH (图左侧); 若是 8 号化合物和 Tnp-SO₃H 反应则得 11 号产物, 即 sAhx(Trp)-Lys-Lys-NH-(CH₂)₂-SH。同理, 可分别得 9~13 号产物。图中, TFA 是为了除去 Boc 基团; DTT 则是为了还原 S-S 键。文献 [95] 中列出了整个合成步骤的细节。由于作为原料的化合物 1 和 5 都有商品市售, 不难自行制备出这类半抗原。

核酸的汞化步骤大致如下: 先把欲作为探针的 DNA 或 RNA, 超声破解为 300~500 核苷酸长度, 以一种氰化物-核酸复合物的形式分离出来^[57], 然后和内含 5 mM 乙酸汞和 10 mM

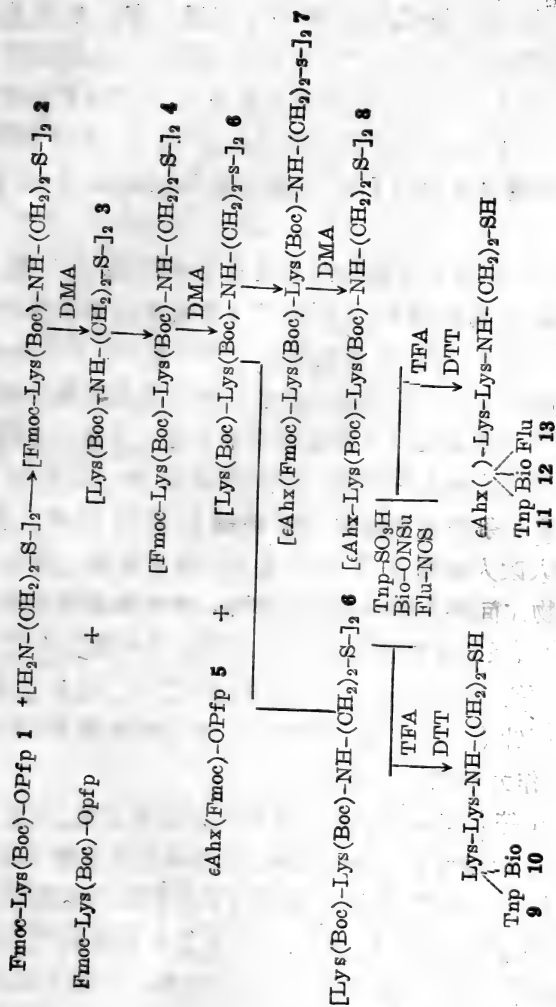


图 5-17 含巯基半抗原配体合成路线(说明见正文)

NaAc, pH 5.5~6.0 的反应液, 50°C 下保温 1 夜。反应是通过加入等体积内含 120 mM KCN, 40 mM NaCl, 2 mM EDTA 的 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) 缓冲液来终止。生成的汞化核酸可用凝胶层析分离出来, 此时可采用预先由内含 1 mM KCN 的 10 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.2) 平衡过的 Sephadex G-25 柱 (8 × 0.5 cm)。

探针核酸中和汞起反应的碱基是嘧啶碱的 O₅ 位。因为汞原子带阳电荷, 容易和图 5-17 所得各种含巯基的半抗原中的巯基起反应, 形成核酞-Hg-S-半抗原复合物。较早, Hopman 等人是用谷胱甘肽和半抗原相连, 由胱氨酸的巯基和汞化核酸的汞原子连接^[57], 结果发现此种探针很不稳定。原来, 谷胱甘肽中的羧基会和核酸链上的磷酸, 因同样带负电, 二者互相排斥, 在不平衡的条件下常使汞—巯基键断裂而裂解。据此, Hopman 等人改为如图 5-17 所示第 9~13 号产物, 即在半抗原和巯基化物之间接上两个赖氨酸残基, 此时赖氨酸上 ε-氨基带正电, 使它和汞化核酸链上的磷酸基团起静电吸引作用, 这就是 Hopman 等人创造的这类非放射性核酸探针, 比其它人的非放射性同类探针稳定得多的原因所在。其机理如图 5-18 所示, 这是用 Tnp 作为半抗原的例子。

Hopman 等人使用这类汞化探针和印渍纸上的卫星 DNA (Satellite DNA) 进行原位分子杂交, 然后采用多克隆羊抗 Tnp 血清作为 I 抗与之反应, 再用偶联着过氧化物酶 II 抗保温, 并以邻苯二胺和 H₂O₂ 作为底物, 使杂交分子显色而检出^[59]。他们用点印渍法比较了目前所有采用非放射性核酸分子杂交探针的灵敏度, 结果表明汞化探针的检出灵敏度大于 Vincent 等人的二硝基苯核酸探针^[60]; 大于或等于最广泛采用的生物素偶联核酸探针^[51~53]。也大于或等于 Tchen 等人最近创立的乙酸氨基荧

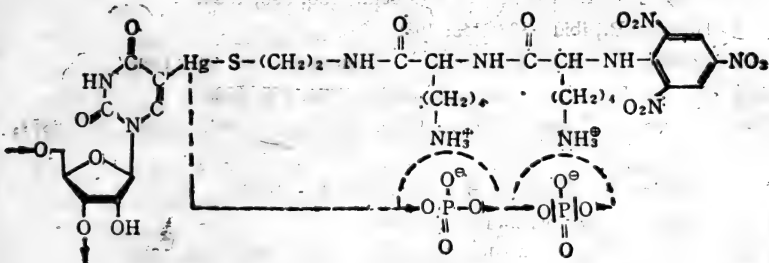


图 5-18 汞化核酸和 Tnp-Lys-Lys-NH-(CH₂)₂-SH
形成稳定复合物的机理
箭头示磷酸连接于核酸链上之位置。

光素标记核酸探针^[61]。

参 考 文 献

- [1] Larsson, L. I., J. Histochem. Cytochem., 29: 408, 1981.
- [2] Nielsen, P. J. et al., J. Biol. Chem., 257: 12316, 1982.
- [3] Reiser, J. and J. Wardale, Eur. J. Biochem., 114: 569, 1981.
- [4] Erlich, H. A. et al., Infect. Immun., 41: 683, 1983.
- [5] Parekh, B. S. et al., Anal. Biochem., 148: 87, 1985.
- [6] Bradbury, W. C. et al., ibid., 137: 129, 1984.
- [7] Hayman, E. G. et al., J. Cell Biology., 95: 20, 1982.
- [8] Cardin, A. D. et al., Anal. Biochem., 137: 368, 1984.
- [9] Thompson, G. A. et al., ibid., 148: 288, 1985.
- [10] 赵永芳和朱勤, 生物化学与生物物理进展, 5: 75, 1986.
- [11] 李宝珪等, 生物化学与生物物理进展, 3: 46, 1986.
- [12] Towbin, H. and J. Gordon, J. Immunol. Methods, 72: 313, 1984.
- [13] Alric, M. et al., Anal. Biochem., 155: 328, 1986.
- [14] Taylor, G. R., ibid., 148: 524, 1985.
- [15] Rordorf, C. C. et al., J. Immunol. Methods, 59: 105, 1983.
- [16] Hawkes, R. et al., Anal. Biochem., 119: 142, 1982.
- [17] Plagens, U. and P. Traub, ibid., 155: 65, 1986.
- [18] Sternberg, J. and P. Jeppesen, J. Immunol. Methods, 64: 39, 1983.

- [19] Pomin, B. A. et al., *Anal. Biochem.*, 136: 390, 1984.
- [20] Howkes, R., *ibid.*, 133: 143, 1982.
- [21] Gordon, J. and M. Rosenthal, *J. Rheumatol.*, 28: 231, 1984.
- [22] Goding, J. W., *J. Immunol. Methods*, 39: 285, 1980.
- [23] Brandsma, J. and G. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 6351, 1980.
- [24] Amasino, R. M., *Anal. Biochem.*, 152: 304, 1986.
- [25] Taylor, G. R. *ibid.*, 148: 524, 1985.
- [26] Chiu, J. F. et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 222: 310, 1983.
- [27] Walsh, B. J. et al., *J. Immunol. Methods*, 66: 99, 1984.
- [28] Pappas, M. G. et al., *ibid.*, 64: 205, 1983.
- [29] Van der Berg, K. J., *Anal. Biochem.* 155: 149, 1986.
- [30] Gershoni, J. M. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 856: 19, 1986.
- [31] Markwell, J. M. et al., *ibid.*, 856: 19, 1986.
- [32] Suzuki, T. et al., *J. Biochem.*, 95: 1193, 1984.
- [33] Schlegel, R. et al., *Cell*, 32: 639, 1983.
- [34] Lentz, T. L. et al., *Science*, 215: 182, 1982.
- [35] Gershoni, J. M. and G. E. Palade, *Anal. Biochem.*, 131: 1, 1983.
- [36] Dion, A. S. and A. A. Poment, *ibid.*, 147: 525, 1985.
- [37] Stellwag, E. J. and A. E. Dahlberg, *Nucleic Acid Res.*, 8: 299, 1980.
- [38] Cardin, A. D. et al., *Anal. Biochem.*, 137: 368, 1984.
- [39] 袁中一等, 固相酶与亲和层析, 科学出版社, 1975.
- [40] Davies, H. M. and B. J. Mifflin, *J. Chromatography*, 153: 284, 1978.
- [41] Karch, H. et al., *Infect. Immun.*, 40: 157, 1983.
- [42] Ohlsson, B. G. et al., *Anal. Biochem.*, 152: 239, 1986.
- [43] Reinhart, M. P. and D. Malamud, *ibid.*, 123: 229, 1982.
- [44] Steup, M. and K-P. Gerbling, *ibid.*, 134: 96, 1983.
- [45] Otto, M. and M. Somejdarka, *ibid.*, 111: 111, 1981.
- [46] Howe, J. G. and J. W. B. Hershey, *J. Biol. Chem.*, 256: 12836, 1981.
- [47] Hunkapillar, M. W. et al., *Enzymol. Methods*, 91: 227, 1983.
- [48] Mendel-Hartrig, I., *Anal. Biochem.*, 121: 215, 1982.
- [49] Hunter, W., *Handbook of Experimental Immunology* (Weir, S. ed.), 3rd Ed., pp. 14~38, Vol. 1, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1982.
- [50] Burnette, W. N., *Anal. Biochem.*, 112: 195, 1981.

- [51] Langer, P. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 6633, 1981.
- [52] Leary, T. J. et al., *ibid.*, 80: 4045, 1983.
- [53] Forster, A. C. et al., Nucleic Acids Res., 13: 745, 1985.
- [54] Smith, H. et al., Nucleic Acids Res., 13:2399, 1985.
- [55] Brigati, D. J. et al., Virology, 126: 32, 1983.
- [56] Landegent, J. E. et al., Exp. Cell Res., 153: 61, 1984.
- [57] Hopman A. H. N. et al., Histochemistry, 84: 169, 1986.
- [58] Hopman, A. H. N. et al., *ibid.*, 84: 179, 1986.
- [59] Hopman, A. H. N. et al., Nucleic Acids Res., 14: 6471, 1986.
- [60] Vincent, C. et al., *ibid.*, 10: 6787, 1982.
- [61] Tchen, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 3466, 1984.

第六章 印渍术在分子生物学与医学领域的应用

从前述五章所涉及的种种实例不难看出,印渍术已在生命学科各领域得到广泛应用,其中包括:生物化学、分子生物学、生物工程学、免疫学、医学、细胞生物学、微生物学、植物生理学、动物生理学等等。在实际应用方面,也已开始作为临床检验、生物化学制药工业和酶制剂工业产品鉴定的方法之一。在这里论及具体应用时,我们不可能面面俱到,只想就印渍术在分子生物学与医学领域的应用作一简要介绍。前者包括生物大分子结构功能、分子遗传学和生物膜学;后者包括免疫学、病理学、临床医学、病毒学、寄生虫学等。

生命学科各领域有着密切的联系,例如对各种遗传疾病中功能畸变基因的剖析,既是分子遗传学的研究课题,也是医学中病理学探讨的目标。因此这里将按印渍术应用于分子生物学和医学领域中所取得的主要成果予以阐述,而不以具体学科归类。这样做,似能从中启发更多的潜在应用,而不会把思路只局限在这两大学科中。

一、在研究生物分子间相互作用中的应用

生物分子间的相互作用,一直是分子生物学和医学领域研究的重点课题,也是生命学科其它领域想从分子水平了解生命

现象必须研究的项目。分子生物学家研究生物分子的相互作用,例如研究 DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-蛋白质、RNA-蛋白质、蛋白质-蛋白质等的相互作用,既是为了揭露各类生物大分子是如何通过相互结合,组成具完整而统一功能的超分子结构;也是为了利用这类相互作用,采用诸如分子杂交等手段进行基因重组等工程。就医学家来说,研究抗原-抗体的相互作用,揭露病毒、细菌、寄生虫和其受体的相互作用,常是为了从分子水平上了解病因,找出诊断和治疗疾病的最佳方案。

就目前而言,有关各类生物分子间的相互作用还没有十分明确和合理的归类法则,尤其是蛋白质-蛋白质相互作用的含义极为混乱。例如蛋白质类的酶-蛋白质底物、蛋白质抗原-蛋白质抗体、蛋白质-受体蛋白、蛋白激素-受体蛋白、糖蛋白-外源凝集素、生长因子-受体蛋白等都属于蛋白质-蛋白质相互作用,但人们又往往把它们分别纳入酶-底物、抗原-抗体、激素-受体等类别。如果想把这些类别归为蛋白质-蛋白质大类中的亚类,则又因酶的底物不一定是蛋白质;能产生抗体的抗原也不一定是蛋白质等而使人无所适从。在印渍术中,更出现了如细胞-受体、病毒-受体等一类相互作用,其中有一些属蛋白质-蛋白质相互作用,有些则不是,有些还尚未查清。基于上述情况,这里只能就事论事地把印渍术已应用于生物分子相互作用的研究归为表 6-1 所示 15 种类别。

印渍术的一大特点,在于利用生物分子间相互作用而予特异性检出。由于亲和的甲、乙双方中,甲方被凝胶电泳分离已有了高纯度,再经印渍固定化,又使它获得了相对稳定性。印渍纸很薄,和凝胶相比,甲方是处在固定化介质表面,这又有了容易和乙方亲近的机会。因为生物分子间相互作用具有高度特异

表 6-1 印渍术在各类生物分子间相互作用研究方面的应用

相互作用类别	被印渍分子	配体	文献
DNA-DNA	pBR 322 质粒 DNA 的 Hae III 酶切片段	pBR 322 质粒 DNA	[1]
	T ₄ 和 λ DNA 的 EcoRI 酶切片段	T ₄ DNA 或 ϕ X 174 DNA	[2]
	人 DNA 的 Hind III 酶切片段	λ DNA	[3]
RNA-DNA	SV 40 RNA 和仓鼠细胞聚(A ⁺) RNA	蛙精 DNA	[4]
	pRAF 87 质粒 DNA	大鼠不同组织的聚(A ⁺) RNA	[5]
RNA-蛋白质	劳斯肉瘤病毒(RSV)外壳的 RNA 结合蛋白	RSV 的 RNA	[6]
DNA-蛋白质	HeLa 细胞核的 DNA 结合蛋白	HeLa DNA	[6]
	蛙病毒(FV 3)的 DNA 结合蛋白	FV 3 DNA	[7]
蛋白质-蛋白质	鼠胰线粒体的钙调蛋白结合蛋白	钙调蛋白	[8]
	组蛋白 H ₃ 和 H ₄	组蛋白 H _{2a} -H _{2b}	[6]
	鼠前脑的钙调蛋白结合蛋白	钙调蛋白	[9]
蛋白质-粘多糖	肝素结合蛋白(脱脂蛋白 apoB ₁₀₀)	肝素	[10]
酶-底物	菠菜或豌豆叶粗提液中淀粉酶	碘化物	[11]
	猪胰匀浆物中蛋白酶类	各种 β -硝基酰替苯胺二肽化物	[12]
	<i>E. coli</i> 的谷酰胺酶和玉米苗谷氨酸合成酶	L-谷酰胺	[13]
	造血细胞胸苷激酶	脱氧胞苷或脱氧尿苷	[14]
抗原-抗体	鼠脑突触体膜蛋白	单克隆抗体 8-2H5, 8-4A5 或 4-4C3	[15]
	血吸虫可溶性尾蚴抗原(SCA)	SCA 抗血清	[16]

(续表)

相互作用类别	被印渍分子	配体	文献
抗原-抗体	阿米巴溶酶体三种酶类(N-乙酰氨基葡萄糖苷酶; β -葡萄糖苷酶; α -甘露糖苷酶)	各酶的单克隆抗体	[17]
	革兰氏阴性菌外膜脂多糖	脂多糖抗血清	[18]
	小鼠癌胚抗原(CEA)	CEA 单克隆抗体	[19]
蛋白质-受体蛋白	部分提纯的低密度脂蛋白(LDL)受体蛋白	LDL	[20]
	Torpedo 电器官膜乙酰胆碱受体蛋白	银环蛇毒蛋白	[21]
生长因子-受体蛋白	人血清胰岛素样生长因子(IGF ₃)受体蛋白	IGF ₃	[22]
	A-431 细胞膜表皮生长因子(EGF)受体蛋白	EGF	[23]
激素-受体蛋白	肝细胞质膜生长激素受体蛋白	人生长激素	[24]
	甲状腺质膜促甲状腺激素(TSH)受体蛋白	TSH	[25]
膜糖蛋白-外源凝集素	脑膜糖蛋白	伴刀豆球蛋白 A	[26]
	鼠肝细胞质膜糖蛋白	麦胚凝集素	[27]
细胞器-受体	中国仓鼠卵巢细胞的淋球菌菌毛受体	CNBr 裂解的淋球菌菌毛	[28]
病毒-受体	人红细胞影泡副流感病毒(SV)受体	生活副流感病毒	[29]
细胞-受体	人血浆中鼠肾细胞受体	生活鼠肾细胞	[30]

性,当用乙方与之作用时,即使乙方处在其它分子群中,也能识别出甲方而发生相互作用,这就具有了高度灵敏性。显然,印渍术所体现的高纯度、高稳定性、易接近性和高灵敏度,再加上操作简便、装置简单以及多拷贝等特点,使它成为探讨生物分子间

相互作用的优良技术。事实上,除了那些用常规染色剂或用预标记样品显现全谱的少数印渍实验外,其它大量印渍文献都可视为印渍术应用于生物分子相互作用的实例。为了便于理解这方面应用的广泛性,表6-1列出了15类生物分子相互作用的实例。

值得重视的是,利用生物大分子印渍术来探究各类生物分子作用于细胞的分子机理,探究病毒、微生物、寄生虫等感染细胞的分子基础,常是最方便和有效的方法之一。前面,作者曾列举过红细胞膜上副流感病毒受体分子的检出^[29]、人血浆中鼠肾细胞受体的检出^[30]等实例,都能反映印渍术在此领域研究中的优良效果。最近潘华珍等人也用印渍术探讨了补体 C_{3b} 与红细胞膜结合部位与结合的基团^[31]。她们过去曾证明,阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)患者的红细胞对补体溶血敏感^[32],后来又用对唾液酸专一结合的鲎血凝集素处理 PNH 红细胞,证明它能降低补体溶血,间接证明了它与红细胞膜血型糖蛋白的结合。现用印渍术,即先将红细胞膜用 SDS-PAGE 分离,电印渍于 NO 纸,再用辣根过氧化物酶标 C_{3b} 印盖,结果表明 C_{3b} 只和红细胞的血型糖蛋白 A 结合^[31]。由此可见,印渍术能方便而容易地获得生物分子间相互作用的直接证据,从而揭露细胞间相互识别,药物对细胞作用等等的分子机理。此外,正如王家槐所言,研究核酸与蛋白质相互作用已是当代分子生物学中又一个新的热点^[33],正在迅速发展。其中最引人注目的有阻遏蛋白与操纵基因、II型限制性内切酶与接头、氨酰化合成酶与 tRNA 等这一类蛋白质-核酸相互作用的研究。有关核小体、核糖体等庞大的蛋白质-核酸复合体系的探讨,也在不同程度上取得了重要进展^[33]。显然,印渍术在探讨蛋白质-核酸相互作用中是最简便而有效的方法之

二、在基因组 DNA 测序及基因定位中的应用

当今, DNA 序列测定主要有 Sanger 的双脱氧末端终止法, 以及 Maxam-Gilbert 的化学裂解法^[34]。正如黄承汉所言, 这两种方法测定的都是已被克隆的 DNA, 虽说所测 DNA 与其母体一样, 却是“借腹怀胎”, 都是克隆载体和转化后扩增的产物^[35]。那末, 能否直接窥视未克隆的 DNA 序列呢? Church 和 Gilbert 提出的基因组 DNA 测序法对此作出了肯定的回答^[36], 并被人称为直接法^[32]。

Church 和 Gilbert 所创基因组 DNA 序列直接测定法系由原化学裂解法^[37]和 DNA 印渍术结合组成, 其原理如图 6-1。简言之, 用适当的限制性内切酶水解细胞总 DNA, 再进行碱基的

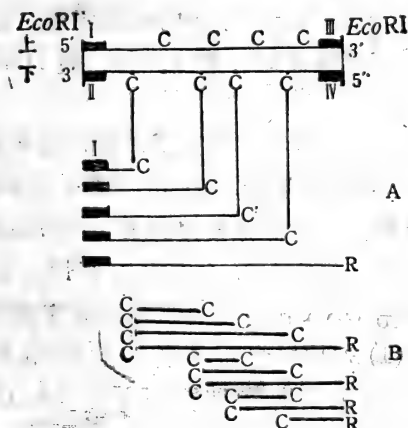


图 6-1 基因组 DNA 序列直接测定法示意图

—示探针, C 为胞嘧啶

A. 能被探针 I 检出的片段; B. 不能被探针 I 检测的片段。

部分裂解(图 6-1 则是以胍解胞嘧啶为例)。此后经 6% PAG 变性电泳,把各单链 DNA 片段分离,再印渍于尼龙膜,并经紫外光照射使之固定化。此印渍纸与特异性 ^{32}P 标记 RNA 探针杂交后,即可通过放射自显影直接读出碱基顺序。由此可见,本法的主要特点之一是引进了印渍术。如图 6-1 所示例子,系用 *Eco*RI 消化 DNA,经胞嘧啶部分裂解,则会产生图中 α 和 b 两类单链片段。再经印渍和杂交,印渍纸上自然只有 α 类片段可与探针 I 杂交,于是在印渍纸的自显影图上,出现一系列和图 6-1 中所示 DNA 链左侧 *Eco*RI 切点到每一胞嘧啶碱基之间距离相当的 DNA 片段。相反, b 类片段因不和探针 I 同源,就不能检出。其它腺嘌呤、鸟嘌呤和胸腺嘧啶碱基的序列也如此操作,组合四组结果即可获得 DNA 全部序列。由于印渍术的最大特点之一是印渍纸可反复使用,因此可依次与图 6-1 中所示探针 I, III(与 DNA 下链互补),或 II, IV(与 DNA 上链互补)进行杂交,故能方便地测出两条链的碱基序列。这样做,省去了原有间接法所需克隆载体这一繁复步骤,使 DNA 测序法更省事、更快速。

值得指出的是,近年已利用 DNA 测序法来分析蛋白质的氨基酸序列。自 1983 年以来,每年用 DNA 测序法分析出氨基酸序列的蛋白质数,已超过直接用经典的 Edman 法测蛋白质序列的数目,而且逐年增大着二者的差距^[88]。目前,印渍术也已参入到这种用 DNA 测序法分析蛋白质序列的过程中,其大致轮廓如下: (1) 选用富含需测蛋白质的组织,分离出总 RNA; (2) 分离纯化出该蛋白质的 mRNA; (3) 以 mRNA 为模板,用逆转录酶催化合成第一 cDNA 链; (4) 碱降解除去 RNA 模板,利用第一 cDNA 链的 3' 末端发夹环作引物,在逆转录酶或(和)DNA 聚合酶 I 作用下,合成第二链的 cDNA; (5) 用核酸

酶 S_1 切割发夹环,生成双链 DNA; (6) 将双链 cDNA 与质粒载体进行克隆,产生 cDNA 文库; (7) 筛选阳性菌落, 即将 NC 纸贴在培养上述含有重组 DNA 杂种分子的转化大肠杆菌的琼脂培养板上,使各菌落印渍于 NC 纸形成复本,在印渍纸上原位消化后,用放射性标记的 DNA 探针进行分子杂交,根据放射自显影谱挑选出阳性菌落; (8) 自母板上挑出由印渍纸指示的相应的阳性菌落,进行扩增; (9) 分离重组质粒 DNA, 经限制性内切酶消化后进行琼脂糖凝胶电泳分离,再印渍于 NC 纸,然后用放射性标记的 cDNA 进行分子杂交,以检出含有插入目的 DNA 的片段; (10) 该 DNA 片段即可按前述间接法或直接法测出 DNA 序列,若用后者,则又将用到印渍术; (11) 根据三联密码,从测得之 DNA 序列推测出目的蛋白质的氨基酸序列。

上述过程,曾三次用到印渍术。当然,虽说借助 DNA 测序法分析蛋白质一级结构已形成主流,但不等于说今后就不会再采用蛋白质序列直接测定法了。事实上新法也有局限性,例如要求组织中 mRNA,具有高丰度的目的蛋白质否则较难实现。又由于由 DNA 序列分析出的蛋白质序列常是蛋白质前体,也不可能反映蛋白质合成后的修饰情况等。基于这些理由,在由 DNA 序列分析出的蛋白质序列前面,必须冠以“推测”两字,借此说明本蛋白质序列可能和其实际序列有某种可能存在的差别。

印渍术也在基因定位中得到广泛应用。首创印渍术的 Southern 曾在 1982 年所写的一篇题为“DNA 分析在绘制人类基因组图中的应用”的综述中强调,要以克隆重组 DNA 技术作为绘制人类基因组图的新策略,并配以最有效的 DNA 测序术,使之尽快绘制出一张能帮助人们把 DNA 结构与染色体功能联系起来的基因图^[39]。就目前而言,绘制基因组图大致分三步:

先在细菌中克隆 DNA 片段,再用凝胶电泳分离限制酶切片段,最后印渍并在印渍纸上进行分子杂交。显然,克隆 DNA 序列的主要目的在于把大的基因组分割成可供分析的小片段,并大量地生产纯化了的片段,这也为其后测出基因组中特定片段所采用的生物学效应之类的方法提供材料。限制酶切图谱的绘制主要在于了解限制酶沿 DNA 链切割的位置,这些位点以后可被用作测量沿 DNA 链长度距离的参考点。印渍纸上的分子杂交则是为了对限制性酶切图谱中的特定序列进行定位。这里举一个简单的例子来说明上述各项原则。假设我们有一个短而纯的核酸序列,比方说,一个人类蛋白质的 mRNA。用目前已报道过的大量方法之一将它标上放射性。此时,它就可用作该蛋白质基因的探针,从随机修剪的人类 DNA 文库中,寻找出含有该蛋白质 DNA 序列的克隆。如果用这种操作使我们找到了两个克隆,那末就说明已鉴定出人类基因组内两个重迭的区域,从而获得了绘制两个克隆所共有的限制性酶切区域图的如下方法:从两个克隆所得的 DNA,可单独地和组合地被限制性酶切割,并用凝胶电泳分离,然后再由两个克隆共同的片段来辨认重迭区域。重迭区以外的图是来自各个克隆所特有的片段,通过把该片段从凝胶印渍于 NC 纸,并用分子杂交检测编码序列,就可以确定各编码序列的位点^[39]。

由上述操作所能测定的 DNA 长度,取决于克隆片段的长短。通常,最大长度可以是克隆片段长度的两倍。实际上,通常可以利用的原核生物运载体的最大插入序列为 50 kb,理论上最长距离应是 100 kb 左右,这个距离相当于一个小染色体的千分之一。

印渍术用于基因定位的又一项例子是由 James 等人进行的^[40]。目前认为,前胰高血糖素原在胰、小肠合成,可能还在脑

内合成。它在胰和小肠内经组织特异性的转译后加工,会产生不同的肽。这些由前胰高血糖素原衍生的肽类中,有一些肽的功能已经清楚。例如糖尿病中危害最大的是由胰高血糖素引起的高血糖症。因此了解胰高血糖素基因在染色体中的位置,将有助于说明这一重要激素在遗传学中的地位。为此,James 等人在建立了人-小鼠体细胞杂交克隆基础上,进行了人的胰高血糖素基因定位。他们把杂交克隆细胞株 DNA,经限制性内切酶完全消化,然后进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,再印渍于 NC 纸,并用含有编码前胰高血糖素原 11~65 序列外显子,和另一个相当于前胰岛素原 66~99 序列外显子的限制酶切片段作为探针。结果表明,这类探针与小鼠和人的 DNA 杂交,分别产生 7.8kb 和 2.0 kb 区带。与此同时,在人-小鼠杂交细胞中凡存在人 2 号染色体的平行实验中,都能显现出 2.0kb 区带,而无 2 号染色体的杂交细胞则为阴性。由此证明,人的胰高血糖素基因应定位于 2 号染色体^[40]。

人的补体 C4, C2 及 B 因子都是由 MHC 的基因编码的,同属 HLA 的第三组抗原^[41]。其中, B 因子为单链的血清蛋白,分子量约为 95,000。B 因子在 D 因子的作用下产生两个片段: Ba ($M_r=30,000$) 和 Bb ($M_r=60,000$)^[41]。有关 B 因子基因的上述定位及其基因结构分析也是采用了印渍术。例如, Campbell 等人利用寡核苷酸法筛选了人肝 cDNA 文库,获得了两株 B 因子 DNA 克隆。其中一株为 515 bp, 定位于 B 因子基因的 Bb 段。用它作为探针与人的染色体 DNA 库杂交筛选后,获得了 4 株平均大小为 40kb 的 B 因子基因克隆。经过限制酶切图谱分析,印渍纸杂交分析和部分 DNA 序列分析后,发现 B 因子基因的 Bb 部分长度约为 4kb。在一段 3.3kb 的 B 因子 DNA 中(包括编码 Bb 残基 87~505 及 3' 非转译区)有 11 个外显子。一

些血清蛋白酶的功能区被外显子分隔在不同的内含子内^[42]。

随着近年来分子生物学的发展，人们花费很多精力试图弄清基因表达及其调控机制。已经提出了许多模型，其中最著名的有乳糖操纵子模型，色氨酸操纵子模型和核糖体蛋白质基因的自身反馈模型等。最近，人们在研究 *E. coli* K-12 株外膜 *Omp C* 蛋白质的基因启动子时，分离出了启动子前面的 300 bp 长度的 DNA 片段。将这个小片段导入 pBR₃₂₂ 质粒，带有这种质粒的大肠杆菌虽然可以正常地产生 *Omp C* 蛋白，但是另一种外膜蛋白质——*Omp F* 蛋白的生产几乎完全被抑制。对此最简单的解释是，从这 300 bp 里可产生出 *Omp F* 基因的抑制因子。这种解释很容易用实验来验证。首先，用实验确定了该区域

(取名为 CX 28 区域，详见图 6-2) 的 DNA 序列，再使用检测启动子用的载体，以证明启动子的存在和转录方向。结果表明，CX 28 区域是以和 *Omp C* 相反的方向转录的。如图 6-2 所示，

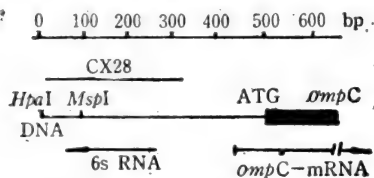


图 6-2 *Omp C* 基因前方的基因的转录

其转录终止部位在 *Hpa I* 和 *Msp I* 两个限制性内切酶的切点之间。此外，从这个区域的 DNA 序列中可以看出典型的转录终止信号。这些都表明 CX 28 区可以转录出小分子 RNA。为了验证这种推测，又用此 CX28 DNA 片段作为探针，去探测印渍纸上细胞抽提液中 RNA 分离物，结果检出了 6S RNA。这说明 CX 28 区可转录出 6S RNA。这种低分子量 RNA 在基因表达调节机制中起着调节因子的作用。这一结果和其它一些证据使日本学者水野猛提出了另一种新的基因表达调节机制——渗透压调节机制^[43]。这一实例也不难看出印渍术在基因定位中所起

的作用。

就人类基因定位的研究而言,1983年第七届国际人类基因定位专题讨论会上统计,已定位的人类基因总数达824个,这比第六届(81年)公布的427个多了近400个^[44]。取得迅猛发展的种种原因中,Deisseroth等人首创的把分子杂交技术应用于基因定位中的策略立下了汗马功劳^[45,46]。DNA印渍术的建立,使分子杂交能在稳定的印渍纸上进行,更加速了这一领域的发展。现将印渍术应用于基因定位的主要步骤归纳如下^[44]:(1)用适当的限制性内切酶分别将来自人类细胞、鼠类细胞,以及由这二者产生的杂种细胞DNA,的进行酶解消化;(2)通过琼脂糖凝胶电泳分离,获取这三种细胞DNA的酶解图谱;(3)以琼脂糖凝胶为印渍模板,把酶切区带印渍于NC纸;(4)用标记好的cDNA探针和印渍纸上的DNA酶切片段进行杂交;(5)通过放射自显影技术将与探针互补结合的一些杂交区带显示出来。

可见其全过程实为常规印渍术操作方法。由此得到的结果如何分析呢?因为不同种的动物中,大多数基因的DNA序列保留的情况和程度是不同的,所以由适当的限制酶切所得DNA的酶切图谱也不相同,具有明显的种属特征。据此,我们可从图谱区带的变化了解到与探针互补结合的DNA序列(基因)在杂种细胞DNA中是否存在。把此结果与杂种细胞中人染色体的丢失情况联系起来,就可以给该基因定位。如图6-3所示,系用印渍纸上原位杂交所作克隆基因定位,由此就能理解这种分析。图中表示出分别用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *Hind III*, 处理人(H)、中国仓鼠(ch)两种亲本细胞,以及这两种细胞融合得到的不同杂种细胞,分别提取的DNA与人的白蛋白基因探针所作分子杂交。由图6-3不难看出,含有人4号染色体的杂种细胞(第3、7列),能显现出单用人细胞DNA进行分子杂交时的同种区



图 6-3 人类白蛋白基因探针与来自人类(H)、中国仓鼠卵巢(ch)细胞,以及以它们为亲本产生的杂种细胞(+、-)的基因组总 DNA,在印渍纸上进行分子杂交所显示的放射自显影谱

各基因组 DNA 杂交前分别用 *Hind* III 和 *Eco* RI 两种限制性内切酶消化,经电泳分离、印渍后杂交。杂种细胞“+”含有人类的 4 号染色体,“—”则不含。

带(比较 1 和 3 列及 5 和 7 列)。相反,不含 4 号染色体的杂种细胞(第 4、8 列)则无此区带。这就表明,人类白蛋白基因是在第 4 号染色体上^[47]。

用印渍术进行基因定位的优越性,还在于可以用它给基因组中一切结构基因定位,只要能获得它的 cDNA 探针就行,而不管这些基因在细胞杂种中是否得到表达。所以,这种方法在给那些为组织专一性功能编码的基因定位中特别有用。此外,这种印渍纸上分子杂交法所用的基因探针可以来自任何物种,只要这些物种的基因组中有足够的、可与人类基因组中相应的基因 DNA 序列发生交叉杂交的类似物即可^[48]。

根据上述原理,印渍术也能应用于染色体精细结构的定位,

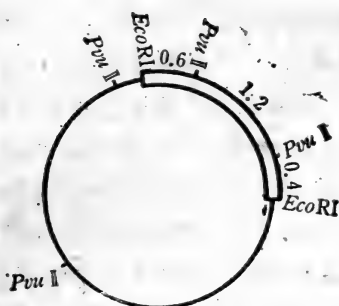


图 6-4 从只含有人 12 号染色体的人/鼠细胞杂种 DNA 克隆出的 2.2 kb 人的重复序列片段(已装入 pBR325 中), 及这一重组质粒中 *EcoRI*、*Pvu II* 两种内切酶的切点

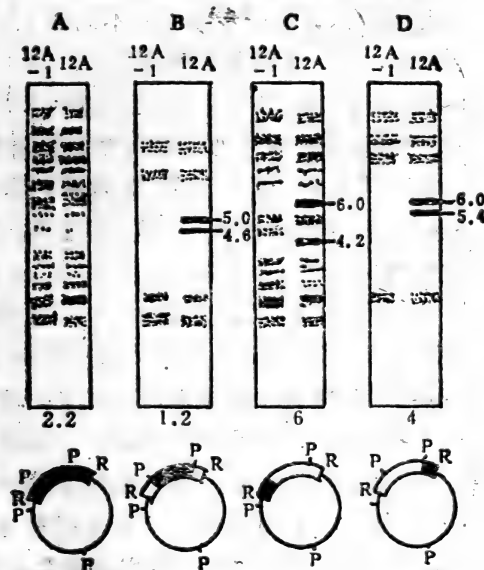


图 6-5 以人的 2.2 kb DNA 重复序列与它的亚片段 1.2 kb、0.6 kb 及 0.4 kb 为探针和具有人类完整的 12 号染色体(12A) 及有短臂末端缺失的 12 号染色体(12A-1)细胞杂种的 DNA 杂交所得的带型图

这类工作最有代表性的可推 Law 等人的实验^[49]。他们把只含有人第 12 号染色体的人-鼠杂种细胞的 DNA, 用限制酶切成许多片段后组装到 λ 噬菌体中, 并从这些重组噬菌体中克隆到一个人的 2.2 kb 重复序列(图 6-4), 并用这个序列作探针。与此同时, 用限制性内切酶 *EcoRI* 消化原杂种细胞的 DNA, 经电泳分离并印渍后, 和上述 2.2 kb 序列探针在印渍纸上进行分子杂交, 结果显示如图 6-5 A 所示多种很清楚的区带。再用限制性内切酶 *Pvu II* 消化 2.2 kb 重复序列, 可得到长度为 1.2 kb, 0.6 kb, 0.4 kb 三个亚片段。把它们作为探针, 分别与原杂种细胞的 DNA 片段杂交, 可得到如图 6-5 B 及 C 所示简单得多的杂交区带。用这三个探针进一步与具有不同缺失部分 DNA 序列的人 12 号染色体的人-鼠细胞杂种 DNA 片段杂交, 就能从各杂交图谱综合分析中, 对 12 号染色体的精细结构进行定位。例如图 6-5 中, 各列凝胶谱的左列是缺失短臂末端的 12 号染色体(12A-1), 右列则具有人类完整的 12 号染色体。比较 4 种探针所得印渍杂交谱(即图 6-5 的 A-D) 不难得出如图 6-6 所示结果, 即缺失短臂末端的 12 号染色体 12A-1, 缺失 6.0 kb, 5.4 kb, 5.0 kb, 4.6 kb 和 4.2 kb 五条带, 它们被定位于 12 pter-12p1205 区域, 而 2.2 kb 则定位在 12q12-12qter 区(图 6-6)。

印渍术应用于基因定位的报道还有许多, 例如 Anurag 等人利用人 β_1 干扰素的互补 DNA 作为探针, 从存在于 λ 噬菌体 Charon 4A 中的基因组 DNA 库中, 分到了两个人的基因组 DNA 克隆- λB_3 和 λB_4 , 并用它们作了 β 干扰素的基因定位^[50]。他们发现 λB_3 和 λB_4 是不同的, λB_3 用印渍杂交法可以转移到人的 2 号染色体上, 而 λB_4 却不能转移到 2、5、9 和 12 号染色体上。更深入的 DNA 印渍实验和核苷酸序列分析表明, λB_4 不存在于 2 号、5 号和 9 号染色体上^[50]。这就改正了过去认为人 β

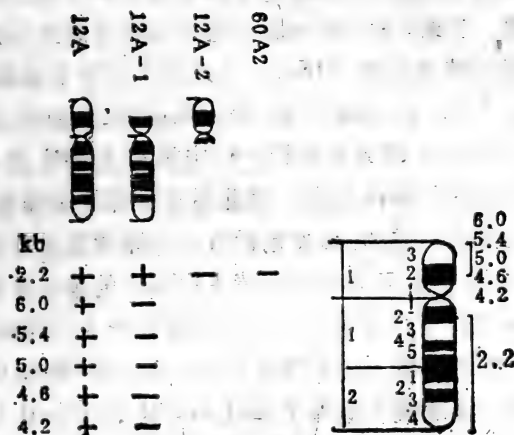


图 6-6 根据 2.2 kb 重复序列和它的亚片段 1.2 kb、0.6 kb 及 0.4 kb 作探针与具有完整的人类 12 号染色体及不同缺失的 12 号染色体的细胞杂种 DNA 杂交显示出的带型(‘+’表示有, ‘-’表示缺失)可把 6.0 kb、5.4 kb、5.0 kb、4.6 kb 和 4.2 kb 5 条带定位于 12pter—12p1205 区域, 把 2.2 kb 定位在 12q12—12qter

干扰素的基因存在于 2、5、9 号染色体的结论。

三、在基因结构分析中的应用

基因结构中的外显子数目、突变、甲基化程度等都可用印渍术进行分析。

1. 探测基因结构中外显子数目

在 Southern 创立印渍术后不到两年, 法国的 Chambon 研究小组在用印渍术分析鸡卵清蛋白基因时, 发现高等真核生物基因中含有不编码的插入顺序^[51]。这项在分子生物学发展

中具深远意义的辉煌成果,也使印渍术名声大振,并很快得到推广和应用。当时,Chambon 小组是以鸡卵清蛋白的 mRNA 为模板,经反转录后得 cDNA。用此作为探针去探测印渍纸上小鸡基因组 DNA 的 *EcoRI* 和 *HindIII* 限制酶切片段。因为事先已经知道这种 cDNA 探针序列中没有 *EcoRI* 和 *Hind III* 这两种限制性内切酶的切点,因此用这种探针去和印渍纸上由这两种酶切片段形成的、其中包括有一段卵清蛋白基因的序列进行分子杂交,理应只显示鸡卵清蛋白基因的单一区带。但是,实验结果却获得了好几条区带。这只能解释为,鸡卵清蛋白基因的 DNA 序列是被一些不能转录为成熟卵清蛋白 mRNA 的序列所分割,这些插入序列中含有 *EcoRI* 和 *Hind III* 这两种限制酶切点,致使印渍谱上显现出几条区带。

现在已经肯定,基因内存在不编码插入序列是真核生物基因中存在的普遍现象,并因此被称之为断裂基因(Split gene),印渍术也就成为探测基因内有否内含子、有多少内含子的方法之一。例如,属于多肽类激素的胃泌素(Gastrin)公认是胃酸分泌的主要调节因子,有关胃泌素基因已从人 DNA 基因文库中分离出来。Wiborg 对携带人胃泌素基因组的噬菌体基因文库进行筛选,得到有人胃泌素 cDNA 克隆的 30 个噬菌斑杂种。经纯化分离得到的 DNA,用限制性内切酶消化并用核酸印渍术分析^[52]。结果表明,人胃泌素基因约有 4100 bp 包含有两个内含子。内含子 I 有 3500 bp,它位于起始密码子 ATG 上游 5 bp 的 5' 端非编码区内。内含子 II 有 129 bp,它能将编码胃泌素主要激素活性部分的区域,与编码胃泌素前体蛋白质主链 N 端部分的区域分隔开,这是内含子分隔功能性区域的又一个例子^[52]。

微管对细胞形状的维持、细胞运动和细胞内物质的运输关系很密切。微管是由分子量约 5 kDa 的 α 和 β 两种微管蛋白

(Tubulin)构成。微管中, α 和 β 两微管蛋白亚单位形成异质二聚体,在数量上两亚单位大致相等。早在1978年,英国剑桥大学的Cowan^[53]小组从鸡中分离出编码 α 和 β 微管蛋白的mRNA,并证明 α 和 β 蛋白质是分别由两种不同的基因,即 α 、 β 微管蛋白的基因编码出来的。他们用来自不同鸡种的微管蛋白mRNA构建的cDNA作为探针,经核酸印渍术分析,发现鸡 α 和 β 微管蛋白基因在单倍体基因组中都分别含有4个不同的基因拷贝。他们建议在 α 和 β 右下角标号,如 α_1 、 α_2 、 β_1 、 β_2 等,来表示不同的拷贝。以后,Cowan等人用鸡 β 微管蛋白基因作探针来筛选人基因文库。经核酸印渍术分析,发现含 β_5 微管蛋白基因的6.8kb片段含有三个非编码区及三个插入重复结构。又揭示,微管蛋白基因组内存在有许多功能性的假基因^[54]。所谓假基因,是指与某功能性基因在核苷酸序列上有明显的同源性,但又由于各种各样的突变,使其不能正常表达的一段DNA片段。

人体 α_1 -抗胰蛋白酶是一种重要的血浆蛋白酶抑制剂。它经被动扩散进入肺泡结构,能与多核白细胞的弹性蛋白酶(Elastase)结合生成酶和抑制剂的等摩尔复合物,使肺的弹性纤维免遭弹性蛋白酶的水解,从而保护肺泡结构。在临床上有先天性 α_1 -抗胰蛋白酶缺陷的病人,较一般人患肺气肿阻塞者要高20~30倍。Leicht等人利用狒狒 α_1 -抗胰蛋白酶cDNA克隆作为杂交探针,从人体基因组DNA库中筛选出 2×10^6 个噬菌斑,并获得了它们的分离物。经过DNA印渍术分析和电镜观察证明, α_1 -抗胰蛋白酶基因位于人体基因组经EcoRI消化所得9.6kb DNA片段内,全长约5千bp;确定了该基因有4个外显子,长度分别为0.71、0.33、0.13和0.27kb,3个内含子分别长1.45、1.15和0.8kb;证明了人体 α_1 -抗胰蛋白酶和鸡卵清蛋白

分子间存在着同系顺序,二者属同一蛋白质亚族等^[55]。

2. 探测基因结构中甲基化程度

印渍术在分析 DNA 序列中甲基化程度也十分有用。如所周知,在哺乳动物细胞的 DNA 序列中含有一种 5-甲基胞嘧啶 (5^mC)。在人类 DNA 中 5^mC 约占全部胞嘧啶碱基的 3.5~4.4% 左右,且在其 3' 端常与鸟嘌呤碱基为邻,即 5'- 5^mCG -3'。许多实验证明, DNA 的甲基化与基因激活、分化发育、癌变机理、细胞表型等有关^[56]。例如, Razin 等人认为,活动着的基因是处在低甲基化状态,而不活动的基因是高度甲基化的^[57]; Razin 证明,受精后早期胚细胞 DNA 是比较低甲基化的,随着胚胎组织分化成熟就逐渐甲基化^[58]; Groffen 等人在培养貂细胞时证明,其正常细胞原癌基因 *C-fes* 的活动与甲基化程度呈负相关^[59]; Feinberg 证明,在人类结肠癌和肺癌中,生长激素基因、 α -珠蛋白与 γ -珠蛋白基因都是低甲基化的,而原发性肝癌则更低^[60]。由上可知,深入研究 DNA 序列甲基化程度具有重要的生物学意义,而生物大分子印渍术则为此种探测提供了一种极佳的方法。

基因甲基化的水平可通过限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hpa* II 分别消化欲测 DNA,再经凝胶电泳分离并印渍于固定化纸后,比较这两种酶的印渍谱就能求得。因为 *Msp* I 和 *Hpa* II 的切点均在 CCGG 处,如果此序列中的胞苷甲基化,即: C^mCGG 时, *Hpa* II 就不能切割了,而 *Msp* I 仍能切。因此,比较同种基因的 *Hpa* II 和 *Msp* I 消化印渍谱,就能反映出该基因的甲基化程度。Kunnath 等人就是这样做的^[61],他们研究了大白鼠 rRNA 基因中 CCGG 序列的甲基化。做法是,把大白鼠 rRNA 的基因分别用 *Hpa* II 和 *Msp* I 消化,所得产物经电泳并印渍于 NO 纸,然后用 ^{32}P 标记的大白鼠 rRNA 与其杂交,求出该基因上两种

酶的切点数与甲基化之间的定量关系^[61]。他们发现,妊娠第 14 天的母鼠,其肝脏 rRNA 基因中很少有甲基化。到了第 18 天,约有 30% 的 rRNA 基因被甲基化,并且一直持续到成年仍保持着这一水平。但是到了成年, DNA 甲基化的模式发生了改变,由连续甲基化模式变为不连续甲基化模式^[61]。前者是指 CCGG 序列中胞嘧啶全被甲基化;后者是指该序列中约有 80% 的胞嘧啶被甲基化,这可能是由于基因中含有非甲基化区域的缘故。

3. 分析基因突变

印渍术也被用于基因突变的研究。突变,即是基因结构的改变。从噬菌体到人类,突变是一种普遍存在并经常发生的生物学现象。它既可能使一个群体获得有利的适应进化的生存结构,也可能使一个群体从此蒙受有害的遗传负担。分析与检测这些突变,无疑是分子遗传学研究的重要方面之一。DNA 突变的基本形式包括碱基取代、插入、缺失、颠换及易位等。有关基因突变的检测,目前主要有三种办法^[62]:生物大分子印渍术、寡核苷酸杂交技术和核酸酶裂解的变性电泳技术。其中,凡导致限制性内切酶切点增加或丢失的单个碱基置换,原则上都可用印渍术直接检出^[62]。

基因突变的结果产生了 DNA 的多态性。所谓 DNA 多态性是指染色体 DNA 等位基因中核苷酸排列顺序的差异性^[63]。在生物进化过程中,由于种种原因引起的基因突变和 DNA 分子结构重排,都会使 DNA 分子内核苷酸排列顺序发生改变。当这种改变影响到编码基因或非编码基因中限制性内切酶识别位点时,利用限制性酶切图谱分析,就可以检测出这种存在于群体之内的 DNA 多态性,并称此为 DNA 限制性片段长度多态性 (DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms, 简称

RFLPs)。显然,印渍术既然能用于基因突变的测定,也就成为检测RFLPs的主要方法了^[63]。例如,鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)是肝脏线粒体中的一种酶,它的缺失将产生一种严重的性连锁的先天代谢缺陷。症状为氨中毒、蛋白质不耐性和精神迟缓,若是男性则会早期夭亡。由于OTC在羊膜细胞中不能表达,无法用羊膜穿刺术进行产前诊断。胎儿肝脏活组织检查法因有危险性也难采用。Rozen等人据此将人体外周血淋巴细胞或培养的皮肤成纤维细胞中的DNA,用几种不同的限制性内切酶消化,电泳分离后印渍于NC纸,再以OTC的cDNA为探针,对印渍纸上的酶切片段进行分子杂交。观察印渍纸上杂交谱,发现其放射性强度有着X染色体剂量效应,表明反映的是X染色体上的基因片段^[64]。当他们用*Msp* I限制酶消化时,除了可产生几个固定片段:17.5, 5.4, 3.5, 2.0和1.9kb外,还能产生两个可变片段,并表现为两种不同限制性片段长度多态型。其中一种的可变片段为6.6和6.2kb;另一种则为5.1和4.4kb。据此他们按四种类型进行了单型分析,其各自频率经35例正常人检查分别为: A (6.0+5.1 kb)=0.45; B (6.6+4.4 kb)=0.16; C(6.2+5.1 kb)=0.28; D(6.2+4.4 kb)=0.11。由此推算出有69%女性,其两条X染色体具有不同的单型,即RFLP杂合^[64]。利用此种单型分析,可对OTC家族中RFLP杂合女性提供遗传咨询。例如,某男性患儿OTC缺失,属A型,而其母为AC型,则可肯定OTC突变必定位于母亲的A型X染色体上。其儿子中属A型者为患者,属C型则正常;然获得A型的女儿则为携带者。如果患儿与其祖父母同型,则可知在其母亲或本人的X染色体上新发生了自发突变。对几个家族的研究结果表明,此项分析与常规谱系分析相吻合。

糖尿病是一种常见病,各种族人群的发病率均在1~2%左

右,并且随年龄增加而增加,65岁以上的发病率可高达5%。糖尿病有胰岛素依赖性糖尿病和非胰岛素依赖性糖尿病两种类型。后者一般在40岁以后发病,发病率较高,占糖尿病患者总数的85~90%。现在认为,非胰岛素依赖性糖尿病有很强的遗传现象,发病原因很可能和胰岛素基因5'-端的调节基因区段上出现异常序列有关^[65]。为此研究了胰岛素基因5'-端邻近区的多态性。方法是:先从周围血液的有核细胞分离出染色体DNA,用限制性内切酶消化后进行琼脂糖凝胶电泳,经印渍于固定化纸,再用³²P-胰岛素基因作探针进行分子杂交,从放射自显影谱上检测多态性片段^[66]。Rotwein等人用此法分析过87例胰岛素基因5'-端邻近区的多态性。当用限制酶BglI水解白细胞染色体DNA时,印渍杂交表明,多态型中具有1.5kb插入序列的类型,在非胰岛素依赖性糖尿病患者中出现的频率高达65.7%,而正常人为25.7%^[67]。

印渍术在基因结构分析中的应用相当广泛,尚不止于上述诸项。事实上,当我们翻阅近代任一期《Nucleic Acids Res.》这类杂志时就会看到,用于基因结构分析的印渍术,每期至少有2~3篇报道。例如该杂志14卷16期上,就有Farther等人用印渍术分析酿酒酵母TRp4基因^[68],以及Datton等人分析鸡组蛋白基因^[69]两篇论文,而该期上发表的与印渍术有关的文章共有6篇之多,充分反映了印渍术在分子生物学中所占地位。

四、在基因表达、基因筛选及基因工程等方面的应用

基因表达,尤其是基因表达调控机理的研究,是当代分子生物学中又一重点领域。通常,可把基因表达归为两类:一是通过

基因工程,把目的 DNA 重组入某种载体 DNA 中,然后了解该目的 DNA 如何表达;二是研究正常和异常细胞中 DNA 表达有何差异。前者又常称为转移基因的表达。如果真核生物基因转移获得成功,将对医治遗传疾病、培育和改造农、牧业良种带来巨大的经济利益。显然,要想使基因转移成为常规手术,就必须对基因表达的调控机理有深入的了解。目前人们特别重视基因的 5' 端,认为这里往往是基因调控的部位。图 6-7 是真核生物基因的一般结构,其 5' 前面的非编码区易受激素、聚合酶作用。mRNA 的转录也从这里开始,在其前面 30 个核苷酸处有一 TATA 盒,估计与聚合酶有关。再前面 1 个位点可能与转录起始有关。如果我们切掉基因结构中前面的序列,基因则不表达。此外,转移基因表达是否理想,就必须进行鉴定,这都要用到印渍术。例如,黎志豪^[70]把鸡卵白蛋白(Ovalbumin)基因转入鼠细胞后,就是用 DNA 印渍术来鉴定该基因的表达情况。此时,把转染细胞中提取的 DNA,经限制性内切酶消化后用琼脂糖凝胶电泳进行分离,再印渍于 NC 纸。用切口移位法制得鸡卵白蛋白基因的 ³²P-cDNA 作为探针,在印渍纸上进行分子杂交。如果转染细胞 DNA 中带有鸡卵白蛋白基因,那么杂交后则被保留下来,放射自显影谱上就可见到区带。相反,没有杂交上的探针则被冲洗掉^[70]。

崔宏等人^[71]成功地应用增加质粒拷贝数的方法,提高了人

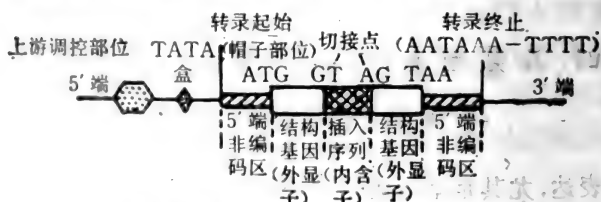


图 6-7 真核生物细胞基因的一般结构

α D 型干扰素基因在大肠杆菌中的表达水平。其中,有关他们组建的新质粒 pBV 181 的 DNA 分析,就是采用了印渍术。他们指出,用基因工程技术在大肠杆菌中生产人干扰素,需要组建高效表达质粒。为此他们组建了一个新质粒 pBV 181,使干扰素表达水平提高约 5 倍。

尿激酶基因工程的研究中也采用了印渍术。美国 Abbott 实验室的 Ratzkin 研究小组报道了许多有关人尿激酶基因克隆的工作^[72,73]。在鉴定重组质粒时,他们采用了溴化氰活化纸进行印渍,并用放射免疫检出法证明, *E. coli* x-1776 株-pABB26 和 *E. coli* x-1776 株-质粒 pABB19 两个重组子能表达尿激酶蛋白,虽说表达水平还比较低。

谷淑燕等人在把 EB 病毒核酸片段重组于噬菌体 M13mp8 的研究中,制备了敏感的核酸杂交实验的探针^[74]。她们也用这种探针进行印渍纸上的分子杂交。因为这种探针是单链的重组噬菌体 DNA,杂交实验时就省去了双链 DNA 预先变性步骤。又因其不会在杂交过程中发生自身退火现象而具高效率。

有关比较正常和异常细胞中基因表达水平的研究中,印渍术也发挥了重要作用。李宝珪等人^[5]利用 DNA 点印渍术定量地测定了大鼠肝和卵黄囊中甲胎蛋白及白蛋白基因的表达。在哺乳动物的正常发育中,甲胎蛋白首先由卵黄囊,随后由胚肝合成。它的含量在胎儿血清中最高,临近出生时开始降低,出生后急剧下降,很快即达很低水平。与此同时,由肝脏合成的白蛋白却不断升高,出生后不久即可达正常水平,并保持稳定,二者互为消长。但是,当成年动物发生肝癌等病变时,这种表达关系将发生变化,血清中甲胎蛋白含量急骤升高。因此现在常将血清中甲胎蛋白和白蛋白含量的变化,作为肝癌早期诊断的指标。许多研究工作表明,血清中甲胎蛋白和白蛋白的

含量变化,主要是由于基因转录或转录后水平的差别所引起,认为这种差别可以用来研究真核细胞基因表达^[70]。李宝珪等人用点印渍术能很方便地定量检出甲胎蛋白和白蛋白基因的转录产物—— mRNA_{AFP} 和 mRNA_{Alb} 。此时,他们把扩增并纯化的,含大鼠甲胎蛋白(AFP)基因片段的质粒 pRAF 87 和 pRAF 65,以及含大鼠白蛋白(Alb)基因片段的质粒 pRSA 1³ 和 pRSA 57,分别等量混合,制成浓度各为 $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 $4 \times \text{SSO}$ 溶液,以每点 $5 \mu\text{l}$ 量点于预平衡处理过的 NC 纸,并以等量的质粒 pBR 322 作为对照。点样后,印渍纸经猝灭,再和 ^{125}I 标记大鼠不同组织的 $\text{poly}(\text{A}^+)\text{RNA}$ 杂交。经放射自显影后杂交区带用计数器定量。结果如表 6-2 所示,它充分证明了 AFP 和 Alb 二者互为消长的规律^[5]。

表 6-2 大鼠不同组织中 mRNA_{AFP} 和 mRNA_{Alb} 的相对含量

组 织	DISC 点计数(cpm)*		$\text{mRNA}_{\text{AFP}}/\text{mRNA}_{\text{Alb}}$
	mRNA_{AFP}	mRNA_{Alb}	
正常成年大鼠肝	11	1577	0.007
大鼠胚肝(16~18天)	561	840	0.68
大鼠卵黄囊(16~18天)	11.9	1	1139

* 已减去 pBR322 对照点的背景数;DISC 为点印渍免疫测定法缩写。

多种急性转化性逆转录病毒能编码特异性的酪氨酸蛋白激酶,这种酶在结构与功能上与某些细胞表面的生长因子受体相似。其中, Gardner Rosheed 猫肉瘤病毒(GR-FeSv)的致癌基因 *fgr* 就能编码这种酶。与此致癌基因相当的人原癌基因 *c-fgr* 被定位于人 1 号染色体短臂上。Cheah 等人用 RNA 印渍术研究了这种原癌基因能否在人肿瘤细胞中表达这一重要命题^[77]。他们首先从一系列不同的人肿瘤细胞中提取 RNA,通过寡聚胸苷亲和柱层析筛选出 mRNA,然后借助 RNA 印渍术检

出为 *c-fgr* 编码的 mRNA。结果表明, 来自骨髓增生性或淋巴瘤增生性疾病 11 个细胞系中, 有 6 个细胞系为 *c-fgr* mRNA 阳性, 并测出 *fgr* mRNA 的长度为 3 kb。证明原癌 *fgr*-mRNA 在淋巴瘤系中的表达与 EBV 感染有关, 认为 EBV 感染可能是激活了 *c-fge* 的转录。

朱读章^[78]在研究脂多糖刺激的 Balb/c 小鼠脾细胞免疫球蛋白轻链基因的表达频率中, 也采用了 DNA 印渍术。用它分析了特异性免疫球蛋白轻链基因, 证明提供重链的细胞株融合要比提供轻链的细胞株融合, 其抗体特异性频率要高 37 倍^[77]。

分离基因是进行基因工程, 研究基因结构功能的首要环节, 但分离得到的基因是否是目的基因呢? 这就需要筛选、甄别。目前已有许多筛选基因的方法, 但大都以核酸杂交为基础, 因此印渍术在基因筛选中就扮演了重要角色。有关印渍纸上进行核酸分子杂交, 已在前面谈过许多, 把它用于基因筛选, 目的虽有不同, 但方法并无两样, 这里不再多述。值得提出的是, 用核酸作探针筛选基因的方法有一定局限性, 因为必须对目的基因所编码蛋白质的氨基酸序列要有所了解, 至少要已知部分氨基酸序列, 才有可能设计寡聚核苷酸作为引物或探针。此外, 由于某些氨基酸密码的第三位摆动性, 合成的寡聚核苷酸片段必定是混合物, 对筛选的专一性和成功率就有所影响^[78]。1983 年美国斯坦福大学 Young 和 Divis 设计了用蛋白质抗体直接筛选基因的有效方法, 并用此法筛选得到了酵母 RNA 聚合酶 II 基因, 末端转移酶基因、鼠粘连蛋白基因、人岩藻糖苷酶基因等^[78]。

五、在遗传疾病诊断和治疗中的应用

迄今, 对遗传疾病的诊断主要还是通过表现型, 即临床症

状或某种酶,以及遗传规律来推测其基因型。对遗传病的治疗也仅限于对表现型的有限修饰。从医学角度看,基因定位和研究基因结构的目的,是实现遗传病的“逆诊断”(即根据基因型来确定表现型)和基因治疗,以便从根本上提高人的素质。现在已有一些办法进行“逆诊断”。前已提及,限制性内切酶是基因操作的主角,基因组中的一个点突变,或一个片段的缺失、插入或易位,都可能会产生或缺失一个酶切点,从而改变原来限制酶切片段长度。测定这种限制性片段长度多态性,就能直观地显示基因组的改变。然而其中的一些已证明与某种遗传病呈共分离(Cosegregation),可以用来检出致病基因,尤其是隐性致病基因的携带者。“逆诊断”的另一途径是遗传病的特异性探针。例如已从 X 染色体上得到了诊断 Duchenne 氏肌营养不良症的特异性片段;从 21 号染色体上得到了 Down 氏综合症的特异性片段;从小鼠基因组中已分离得到 HGPRT 基因片段,可望用于检出 Lesch-Nyhan 氏综合症。已报道的上述两种“逆诊断”途径都有印渍术参与。对于基因治疗也有新的设想,例如 β^0 地中海贫血症患者不合成 β 珠蛋白链,其中一部分是由于 $\beta^{17\text{Lys}}(\text{AAG}) \rightarrow \text{UAG}$ 与 $\beta^{39\text{Gln}}(\text{CAG}) \rightarrow \text{UAG}$ 这两个无义突变(琥珀突变)引起的。现在已在体外用“定点诱变”的方法合成了能携带 Lys,而反密码子却与 UAC 互补的称为“琥珀突变抑制”型 tRNA,并能借助爪蟾卵母细胞系统,使 β^0 地中海贫血基因片段准确无误地合成正常的 β 链,从而达到治疗目的。当然,印渍术在基因治疗中是不能直接应用的,但它在定点诱变的鉴定分析中起着一定作用。

Chang 等人曾采用印渍术对胎儿是否存在镰形细胞性贫血症进行产前诊断^[79]。大致做法是,取从白细胞或羊水细胞中提取的 DNA,并用限制酶 Mst II 消化,经 1.2% 琼脂糖凝胶电

泳分离后印渍于 NC 纸,再用正常人 β -珠蛋白基因被 *Mst* II 消化所得 5' 末端的 1.15 kb 片段为探针,并进行印渍纸上的分子杂交。因为已知镰形细胞性贫血患者的 β -珠蛋白基因有一点突变,即由正常人的 CCTGAGG 变为 CCTGTGG。前者正是限制酶 *Mst* II 的识别位点,故可把 β -珠蛋白基因水解为长度分别为 1.15 kb 和 0.2 kb 的两片段;后者不能被 *Mst* II 识别,故只产生一条单一的长 1.35 kb 片段。现用 1.15 kb 的片段作探针,就可以在 AA 基因型中见到 1.15 kb 片段,在 SS 基因型中见到 1.35 kb 段,而在 AS 基因型中见到 1.15 kb 和 1.35 kb 的两条片段。Chang 等人用此法在 5 名有镰形细胞性贫血危险的胎儿中,检测到了相同的胎儿基因型:计有 2 名 AA 型、1 名 AS 型和 2 名 SS 型。他们指出,此法灵敏度极高,只需 1 μ g 基因组的 DNA 即能得到可检出的杂交信号。也就是说,只需孕期 15 周到 16 周孕妇的羊水 8 毫升,直接抽提其 DNA,即可用印渍术检出 *Mst* II 酶切片段。此法为镰形细胞性贫血的产前羊膜穿刺诊断,提供了一种既安全又精确的方法。它无需作细胞培养,因此实验时间从原需 5 周缩短到两周,减少了实验的复杂性和成本费用。他们又认为,此法尚能再进一步简化,以扩大其实用价值^[79]。

Old 等人也用与上述类似方法进行血红蛋白病的产前诊断^[80]。不同的是,他们除了用 DNA 印渍术外,还用限制性片段长度多态性分析,进行直观诊断。此外,曾溢滔等也用点印渍术实现了血友病 B 的产前诊断^[81]。

非缺失型 α -地中海贫血的概念首先由 Kan 等人采用分子杂交技术而提出的,他们认为这种 α -地中海贫血的病因并非 α -基因的缺失,而是 α -基因功能的缺陷。以后许多学者先后用限制性内切酶技术予以证实,不仅绘制了人 α -基因内及外围的内切

酶位点图,而且能在基因水平上对 α -地中海贫血进行实际诊断,方法就是采用 DNA 印渍术。即,先从患有或怀疑有非缺失型血红蛋白 H 病(HbH)病人细胞中提取 DNA,用限制酶消化后进行琼脂糖凝胶电泳分离,再印渍于 NC 纸,然后用 ^{32}P 标记的 α -珠蛋白基因特异性探针进行分子杂交,放射自显影鉴定含有 α -珠蛋白基因的 DNA 片段^[82, 83]。有关 HbH 的细节可参阅朱康儿的综述^[84]。

Franzén 等人报道了使用恶性疟原虫重复 DNA 探针诊断疟疾^[85]。他们用恶性疟原虫的重复 DNA(pRepHind),以 ^{32}P 标记后作为探针,与被检血样中的 DNA 进行点印渍杂交而检出。大致做法是,从 $50\ \mu\text{l}$ 被检者血中提取出 DNA,变性后,用毛细管以每点直径 2 mm 的小圆点,点样于 NC 纸上,经猝灭后把印渍纸浸入含 ^{32}P -pRepHind 探针的杂交溶液中, 65°C 下反应 2 小时,然后进行放射自显影 10 小时并观察结果。图 6-8 出示了各种浓度恶性疟原虫 DNA 和间日疟原虫 DNA,以及非感染红细胞(6 行 C)和人胎盘 DNA(6 行 D)的点印渍结果。由此标准谱证明,此法能检出疟原虫血症的浓度为 0.001%。出现阳性征象所需要最小恶性疟原虫 DNA 的量为 25 pg。Franzén 等人用此法试验了 35 位恶性疟原虫或间日疟原虫感染病人的血标本。在恶性疟病人中,除了一份血标本外均达阳性征象。而且阳性征象者均能相当好地表明感染程度。在间日疟原虫感染的血标本中,也除一份外均为阴性,而此阳性标本被认为并有恶性疟原虫感染。Franzén 等人组建的这种 pRepHind 探针似有种特异性,与其它一些疟原虫 DNA 及人类 DNA 无交叉融合现象。他们认为此法可用于大规模人群筛选,并能检出含疟原虫量较少的标本;还可以用于血库血筛选检查^[85]。

Lau 等人创立了一种用 DNA 点印渍术快速确定胎儿性别

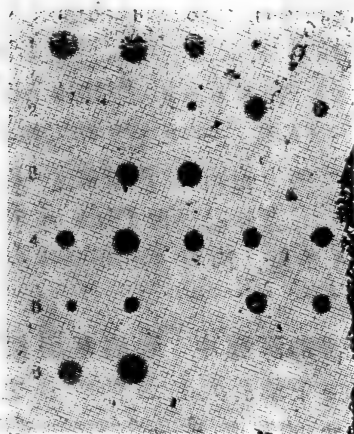


图 6-8 恶性疟原虫重复 DNA 探针用于疟疾诊断的点印渍分析

第 1 行 恶性疟原虫 DNA: a: 250ng, b: 25ng, c: 2.5ng, d: 250pg, e: 25pg,

第 2 行 a、b: 0.5%、0.5% 间日疟原虫; c、d、e: 0.5%、0.5%、0.8% 恶性疟原虫

第 3 行 a、d、e: 0.5%、0.5%、0.4% 间日疟原虫; b、c: 1.6%、0.9% 恶性疟原虫。

第 4 行 a~e: 0.7%、0.7%、0.7%、0.7%、1.0% 恶性疟原虫。

第 5 行 a~e: 0.1%、0.5%、0.1%、1.0%、0.7% 恶性疟原虫。

第 6 行 a、b: 0.8%、2.8% 恶性疟原虫; c: 50 μ l 非感染红细胞; d: 250 ng 人胎盘 DNA。

的方法^[86]。他们从人染色体的异染色质 3.4kb 重复序列中, 获取了一种男性特异的 DNA 杂交探针, 并取名为 Y-特异 3.4kb 探针。它能与 *Eco*RI 消化的男性染色体 DNA 杂交, 而与女性 DNA 无反应。后来证明, 该探针与男性 DNA 的亲合力较女性 DNA 大 1000 倍之故。用此探针测定胎儿性别的大致步骤如下: 取 0.2ml 羊水, 离心分离细胞, 将细胞絮状物在碱性溶液中加热使 DNA 解链。冷至室温后把此 DNA 以小圆点点于 NC 纸, 分别用 Y-特异 3.4kb 探针和 *Alu* 重复序列探针进行印渍纸上分

于杂交。Alu 重复序列探针与男、女性均能杂交,在此用作对照。因探针均用放射性标记,杂交斑点可从自显影谱上定量求得。凡男性者,其 DNA 与 Y-特异 3.4 kb 探针和 Alu 重复序列探针均能杂交;而女性 DNA 仅与 Alu 重复序列探针杂交,据此即可确定胎儿性别。Lau 等人指出,此法仅需 2~3 天。作为常规检测时,仅需羊水 200 μ l,且不必提取 DNA,也不需要规定羊水标本中细胞数或 DNA 浓度,因为 Alu 重复序列探针已提供了存在的 DNA 量的对照^[86]。

在细胞癌变原理的研究中,致癌基因假说已经成为当代分子生物学和医学中最引人注目的学说之一。致癌基因 (Oncogene, 简称 *onc*) 的发现,被称为分子肿瘤学的里程碑。迄今,不仅发现了 20 余种致癌的 RNA 病毒的病毒致癌基因 (Viral oncogene; *v-onc*), 而且也在脊椎动物的正常细胞中发现了与 *v-onc* 同源的 DNA 序列——细胞癌基因 (Cellular oncogene; *c-onc*)^[87,88]。 *v-onc* 和 *c-onc* 的同源性常是用 DNA 印渍术分析得到的。例如 Goff 等人^[89]将 Ablson 小鼠白血病病毒 (A-MuLV) 的 DNA,先后在噬菌体 Charon 21A (Ch 21 A) 和质粒 pBR 322 中克隆和次级克隆,得到了 A-MuLV 的 *onc* 片段 *abl*,经切口移位法制得长度为 2.3 kb 的 ³²P-*abl* 探针。再把人 HeLa 细胞经 *Eco*RI、*Hind* III 和 *Bam* I 等限制性内切酶消化,片段用琼脂糖凝胶电泳分离后印渍于 NC 纸,并用 ³²P-*abl* 探针与之杂交。结果发现这些酶切产物中都有 2~4 条杂交区带显现。表明人体细胞中含有 *abl*,且由于这些杂交区带的核苷酸长度比 *abl* 大得多,因此 Goff 等人认为其中含有插入序列。这一实验充分说明 *c-onc* 的存在。

为了进一步研究人体细胞中 *c-onc* 的组成及其序列,必须得到足够量的 *c-onc*。为此,Favera 进行了从人 DNA 中分离完整

的 *c-onc* 片段及其克隆增殖的工作^[90]。他用 ^{32}P -C 60 作探针, 采用点印渍术从人基因库中筛选出含 *c-sis* 的克隆(λ -L33)。把 λ -L33 大量繁殖后抽提其 DNA, 经限制酶切消化, 进行 DNA 印渍术检出杂交区带。结果显示, *Eco* RI 酶切片段呈一条 14.8 kb 的杂交区带, 但菲啶溴红染色带却有三条, 分别为 14.8kb, 20 kb 和 10.5 kb。因 *Eco*RI 能将 *Ch*₄A(重组噬菌体载体)的双臂切掉, 故可知 λ -L33 中 14.8 kb 片段含有 *c-onc* 的片段。为了验证, 把 14.8 kb 片段再用 *Bam* HI 和 *Bgl* II 酶切, 经印渍杂交分析, 所得片段与人 DNA 用同样方法产生的杂交片段大小相同, 说明此 *c-onc* 没有任何部分丢失。经异源双链分析(Heteroduplex analysis)表明 λ -L33 和 λ -C60 的同源区域长度为 1.2~1.3kb。

显然, 象上述分析致癌基因的方法也可以用于了解正常细胞和肿瘤细胞之间基因组上的差异。例如 Humphries 就曾这样做过^[91], 他用于寻找基因组变异的 DNA 探针是从人胚肝 DNA 制得的。他把人胚肝 DNA 经限制酶 *Eco*RI 消化后取其 14 kb 及 50 kb 片段, 再用限制酶 *Sau* 3A 消化, 然后与 PAT₁₅₃ 质粒重组后进行无性繁殖。以 ^{32}P 标记的人基因组 DNA 对 PAT₁₅₃ 重组体克隆菌落进行原位杂交。取无信号或低杂交信号者合并为 100 组, 提取重组质粒 DNA, 经蔗糖梯度离心使质粒 DNA 进一步纯化后, 再用 *Eco* RI 和 *Sau* 3A 混合消化。取此酶解液作琼脂糖凝胶电泳分离, 去掉大分子 PAT₁₅₃ DNA 片段, 其余片段洗脱后用切口移位法进行 ^{32}P 标记, 此即用作肿瘤组织检查的探针。从患有胃肠肉瘤病人的肿瘤组织及其周围组织学上正常的肠粘膜组织中, 提取肿瘤 DNA 及正常 DNA。分别经 *Eco*RI 消化后, 在 1% 琼脂糖凝胶上作电泳分离。以此为印渍模板印渍于 NO 纸, 然后用上述探针在印渍纸上进行分子杂

交,从所得放射自显影谱上比较正常 DNA 和肿瘤 DNA 杂交区带的差异。结果表明,五个病人的正常 DNA 的 *EcoRI* 消化谱中有能与此探针杂交的小于 14 kb 的区带,而在肿瘤 DNA 中消失了。

从以上种种实例中不难看出,核酸印渍术可在许多疾病和病理研究中应用,其关键在于获得合适的杂交探针。值得注意的是,近代人工合成脱氧寡核苷酸的技术日趋完善,因此采用人工合成的各种寡核苷酸探针来诊断遗传疾病已成事实^[92]。例如,Conner 等人^[93]根据地中海性 β^0 -贫血症是由于 β -珠蛋白基因序列中 39 位密码子发生了无意义突变这一原理,人工合成了如表 6-3 所示具放射性标记的 β^A 和 β^{0+h} 两种探针,它们是包含有 β^{39} 的 19 脱氧寡核苷酸。表中,框内的碱基顺序为 β^A 和 β^{0+h} 的脱氧寡核苷酸探针。待检个体白细胞或羊水细胞中 DNA,用 *Bam* HII 酶解后电泳并印渍于 NO 纸,经用 β^A 和 β^{0+h} 探针分别杂交,放射自显影检出。正常者,在 1.8 kb 处仅与 β^A 探针杂交;杂合子者,在 1.8 kb 处与 β^A 和 β^{0+h} 两探针都杂交;纯合子者,1.8 kb 仅和 β^{0+h} 探针杂交,不与 β^A 探针杂交。

人 α_1 -抗胰蛋白酶缺陷病可引起肺气肿、婴儿肝硬化。 α_1 -抗胰蛋白酶系由 394 个氨基酸残基组成,经 cDNA 序列分析已

表 6-3 人 β -珠蛋白基因及 β^A 和 β^{0+h} 两种探针的序列分析

	35	36	37	38	39	40	41	42
	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe	Phe
β^A	5'-TAC	CCT	TGG	ACC	CAG	AGG	TTC	T
	3'-ATG	GGA	ACC	TGG	GTC	TCC	AAG	AAA-5'
	5'-TAC	OCT	TGG	ACC	TAG	AGG	TTC	TTT-3'
β^{0+h}	3'-ATG	GGA	ACC	TGG	ATC	TCC	AAG	A
								AA-5'

证明 342 位上谷氨酸残基密码 GAG 点突变为 AAG。据此, Kidd 等人^[94]用表 6-4 所示人工合成的, 正常的和含有突[变位而异常的 19 脱氧寡核苷酸为探针。实验证明, 使用这两种探针能方便地用印渍术检出 α_1 -抗胰蛋白酶缺陷病。

表 6-4 人工合成抗胰蛋白酶基因探针中正常和异常序列比较

342

	Ala	Val	Leu	Thr	Ile	Asp	Glu	Lys	Gly	Thr	Glu
	5'-GCT	GTG	CTC	ACC	ATC	GAC	GAG	AAA	GGG	ACT	CAA-3'
正常	3'-CGA	CAC	GAG	TGG TAG CTG CTC TTT CCC T						GAG	GTT-5'
异常	5'-GCT	GTG	CTC	AOC ATC GAC AAG AAA GGG A						CT	CAA-3'
	3'-CGA	CAC	GAG	TGG	TAG	CTG	TTC	TTT	CCC	TGA	GTT-5'

注: 框内的顺序为正常及异常的探针

六、在免疫学与自身免疫病中的应用

当前, 免疫学最关心的问题之一, 不是对异己的认识, 而是对自己的认识^[95]。免疫学是在抗传染病的实践斗争中产生的, 它所关心的是抗传染作用。因此, 防御的观点; 一开始就在免疫学中占据支配地位。这样, 自然就把免疫的发生完全归因于异己抗原的刺激, 把免疫看作是单纯地认识并排斥异己的反应。但事实并非如此。首先, 自身抗体和自身免疫病的出现, 就足以说明确实存在能认识自己的细胞; 进而, 外源凝集素 (Lectin) 能诱发产生不同特异性抗体这一事实, 表明不需要异己抗原也能诱发免疫应答。近十年来, 随着免疫生物学和免疫遗传学的进展, 先后发现了独特性抗原和 MHS 抗原在免疫调节中的重要作用。这不仅使人们认识到识别自己是发生免疫应答的基础, 而且找到了自我识别的标志。免疫学就进入了以识别自己为基础

的网络学说时代,而免疫印渍术在其中则起到了促进作用。

研究证明,识别自身抗原而发生反应的细胞是 T 淋巴细胞,并称之为自身反应性 T 细胞 (Autoreactive T cell; 简称 Tauto)^[96]。Tauto 有许多亚群,其中属于辅助性或诱导性 T 细胞 (T_H) 的亚群,在识别自身抗原后,立即发生增殖并释放名为 IL-2 等辅助因子。现已证明,IL-2 不单纯是 T 细胞的生长因子,它还能诱导活化了的 T_H 再释放其它辅助因子,以扩大其辅助功能^[97]。为此,有关 IL-2 的研究就成为揭露自身抗体奥秘和防治自身免疫病的关键一环。人们对人类 IL-2 的基因结构、表达调控及临床应用等都作了广泛而细致的研究^[98]。现在已用基因工程技术生产出大量高纯度的重组 IL-2,为全面揭露 IL-2 在机体自身免疫调节作用中的作用奠定了基础。有关 IL-2 这类研究工作中都有印渍术的参与。例如 Taniquuchi 等人^[99]和 Devos 等人^[100],从各自建立的 cDNA 文库中获取了含编码 IL-2 的基因,把重组质粒 DNA 经限制性内切酶消化,琼脂糖凝胶电泳分离,并印渍于 NC 纸,再用相应细胞 mRNA 作为配体在印渍纸上进行分子杂交。对结合于印渍纸上的 mRNA 进行制备回收,并注入卵母细胞中检测 IL-2 mRNA 的翻译活性。重复此步骤,即可筛选出插入有 IL-2 cDNA 的克隆。Maeda 等人^[101]也采用类似的方法,把印渍于 NC 纸上的质粒 DNA 的限制酶切片段与相应 mRNA 杂交。但他们与上述方法相反,是把未和印渍纸上结合的 mRNA 注入卵母细胞。因为含有 IL-2 cDNA 序列的质粒 DNA 可以封闭编码 IL-2 的 mRNA 的体外翻译活性,所以能选择出含 IL-2 cDNA 的克隆。

现在,IL-2 cDNA 核苷酸序列已经测定,人类 IL-2 基因组组成及限制酶谱如图 6-9 所示。在这方面的研究中,印渍术也作出了贡献。例如 Fujita 等人^[102]以及 Holbrook 等人^[103],都

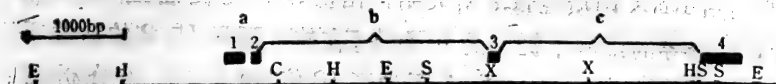


图 6-9 人类 IL-2 基因组成及限制性内切酶切点

用 DNA 印渍术分析了人脾脏、胎盘等的染色体 DNA，并对克隆的 DNA 片段也进行了核苷酸序列分析。证明 IL-2 基因全长 5040 个碱基，包含在两个 *EcoRI* 片段内。与其它真核细胞相同，具有不编码插入序列(内含子)。人基因组 IL-2 序列有 4 个外显子(图 6-9)，外显子 1 含有 5' 端不翻译区，并且含编码 IL-2 起始的 49 个氨基酸，其中 20 个构成信号肽。外显子 1 后面是由 91 bp 组成的内含子 A，其后即为编码 20 个氨基酸的外显子 2。随后依次是：2292 bp 的长间隔顺序(内含子 B)、编码 48 个氨基酸的外显子 3、1364 bp 组成的内含子 C，以及编码 36 个氨基酸的外显子 4。poly A 信号在终止密码后的 261 个核苷酸处。值得注意的是，印渍分析表明，在第二个内含子区有几处与某些潜在病毒增强子核心成分同源。此外，Holbrook 等人的印渍分析发现^[104]，其 5'-末端侧有 4 个区与 T 细胞白血病病毒同源，认为这些区与二者基因特异性活化有关。

为了确定正常与异常组织中 IL-2 基因是否一致，Clark 等人^[105]和 Holbrook 等人^[103]曾对恶性 T 和 B 细胞淋巴瘤细胞、胸腺上皮瘤细胞、T 细胞白血病病毒感染的 T 细胞和白血病细胞等，都进行过 DNA 印渍分析。证明各种来源的细胞均未发现明显的基因多态性、重排或扩增。

在 IL-2 基因表达的调控研究中也应用了印渍术，例如 Hirano 等人^[106]用 RNA 印渍术证明，T 细胞丝裂原-植物凝集素(PHA)、刀豆球蛋白 A (ConA) 等能诱导 T 淋巴细胞 IL-2 mRNA 的产生，而 B 细胞丝裂原-脂多糖(LPS)等则无此作用。

他们用 RNA 印渍定量分析表明, 由佛波脂类促癌剂 TPA 加 PHA 诱导的细胞中提取的 mRNA, 在体外翻译 IL-2 的活性要比单用 PHA 刺激的 mRNA 至少高 10 倍(用其它技术分析时为 8 倍)。他们认为 TPA 与丝裂原在刺激 IL-2 产生中的协同作用是十分重要的; 并认为 TPA 在某种程度上可替代第二信号^[106]。

上面费了许多笔墨, 无非因为印渍术在 IL-2 基因研究中表现突出, 几乎每一关键环节都有它的参与, 包括 IL-2 基因重组、cDNA 的克隆和筛选、序列测定、基因组结构分析及定位、基因表达和调控等。更何况, IL-2 除了在自身免疫机理中占据重要地位外, 也是目前少数几种用基因工程生产的重组药物之一。重组 IL-2 药正在进行亚临床研究, 已初步证明它在自身免疫病、免疫缺陷症, 以及抗肿瘤等病症中有疗效^[108]。

脊椎动物可以产生抗体, 对外源性物质进行应答。这种应答是由抗原特异性相同而效应功能不同的, 多种抗体的相继产生完成的。抗体的效应部位或种类由其重链恒定区 (CH 区) 决定。在小鼠, 已发现有 8 种免疫球蛋白^[107]: IgM, IgD, IgG_s, IgG₁, IgG_{2b}, IgG_{2a}, IgE 和 IgA。已知由第一次接触一种抗原而引发的原发反应可产生 IgM, 而对于相同抗原的继发反应则引起其它抗体的产生, 如血清中的 IgG, 以及粘膜上的 IgA 和 IgM。因此, 在原发和继发应答中可以建立起对抗原的免疫“记忆”^[107]。抗体是由 B 细胞产生, 每一个 B 细胞能在其表面形成表达抗原特异性的免疫球蛋白。每种免疫球蛋白又可以两种型式存在: 结合膜型(m)和分泌型(s)。它们之间的不同, 在于各自重链的羧基末端的差异。抗原刺激一个 B 细胞的结果之一, 就是 m 型到 s 型的转变。在此过程中, 抗体没有发生特异性或种类的改变。因此, 表面免疫球蛋白实是作为 B 细胞接受刺激

而产生抗体的一个外部信号^[107]。有关免疫球蛋白的结构与功能虽已取得了许多进展,但仍存在许多未知数。例如,IgD的功能相对于上述体液免疫应答的情况来说还不清楚,其它种类免疫球蛋白也处在一知半解的状态。印渍术在这种对外来抗原进行应答的机理研究,以及有关疾病临床诊断中也得到了广泛应用。

对脑脊液(CSF)中IgG组分的测定,有助于某些神经系统炎性感染疾病的诊断^[108]。近年又证明,多发性硬化和亚急性硬化性全脑炎等病人,其CSF中某些IgG组分区带含抗病毒抗体,尤其是含有抗麻疹病毒抗体^[109]。为了提高CSF中IgG组分区带测定的特异性和灵敏度,许贤豪采用了免疫印渍术^[110]。他把提纯了的兔抗人IgG吸收多发性硬化病人的CSF,把此样品进行等电点聚焦(IEF)分离,并印渍于NC纸。印渍纸经猝灭后,用过氧化物酶联兔抗人IgG进行免疫印盖,最后在偶氮联苯胺和 H_2O_2 溶液中进行酶染色而检出。他在这类免疫印渍法检出脑脊液的IgG组分区带实验中,在印渍纸上试验了各种免疫过氧化物酶染色法和常规染色法。结果表明,以卵白素-生物素-过氧化物酶复合物染色法最为敏感。它比过氧化物酶抗过氧化物酶染色法敏感2倍;比直接免疫过氧化物酶染色法敏感4倍;比银染色法敏感32倍;比考马斯兰染色法敏感4800~6400倍^[110]。许贤豪认为,这种免疫印渍术的高灵敏度和特异性可用于CSF中有关病毒的抗体和抗原的测定,并有助于其流行病学研究。

Wood等人在研究免疫球蛋白重链和轻链的合成、加工及分泌中,也采用了免疫印渍术^[111]。Lefranc等人也曾用DNA印渍术研究了正常人体免疫球蛋白重链恒定区基因的遗传性缺失^[112]。正常成年人有五类免疫球蛋白:IgM、IgG、IgD、IgE和

IgA, 但 Lefranc 等人用 DNA 印渍杂交却发现一名健康的突尼斯人的血清免疫球蛋白, 仅有 IgM、IgD、IgG₃、IgE 及 IgA₂ 这种异常模式

许多自身免疫疾病, 如风湿病、淋巴细胞增生和感染性疾病等, 病人血清中常常发现高浓度的、在健康人血清中未能检出的低分子量 IgM。所谓低分子量 IgM, 实是五聚体 IgM 的单体亚单位。通常认为, 低分子量 IgM 与循环免疫复合物及风湿因子 (RF) 有关。Koh 等人^[113]用免疫印渍术定量检测了 16 例亚急性细菌性心内膜炎 (SBE) 病人、2 例急性心内膜炎病人, 以及作为对照的 20 例健康人中的低分子量 IgM。与此同时, 又用比浊法等测定各血清样品中的 RF 等。结果表明, 感染性心内膜炎病人存在低分子量 IgM, 也观察到它和风湿因子有密切关系。此外, 血清的免疫印渍谱显示, 这些病人血清中还出现了二聚体 IgM 和寡聚态 IgM, 认为这是一种以 IgM 多聚化为特征的疾病^[113]。

由上可知, 印渍术在免疫学与自身免疫疾病方面已得到广泛应用。事实上, 首创免疫印渍术的 Towbin 等人^[114], 就是用免疫印渍术来研究抗原特性, 以及筛选自身免疫 (结缔组织) 病抗血清。现在, 许多相关抗原中有一些已用免疫印渍术完成了特性鉴定, 并在 Towbin 和 Gordon 于 1984 年发表的免疫印渍术综述文章中, 已用表格的形式列出 (见文献 [115] 之表 VI), 其中的一些是令人鼓舞的。例如, 组蛋白类 H1 和 H2B 显示出是全身性红斑狼疮中主要的全身抗原^[116]; 来自心肌细胞的, 两种分子量分别为 38,000 和 43,000 的蛋白质, 能和风湿热血清中抗体起交叉反应^[117]。此外, Gordon 和 Roseuthal 用点印渍术进行研究, 建立了一套自身免疫图谱, 用来测定抗 DNA 抗体、风湿病因子, 以及针对来自 HeLa 细胞亚细胞分部的抗体^[118]。

此种点印渍检验法已用于临床,且所用血清已被选用为国际标准化参比血清^[115]。

七、在单克隆抗体生产与研究中的应用

自 1975 年 Köhler 和 Milstein 创建了单克隆抗体(以下简称单抗)无限量生产术以来,使得免疫学的理论研究与实践都发生了巨大变革。现在,单抗生产术已成为生命科学与医学许多领域必不可少的重要技术^[119]。

研究与制备单抗的主要目的之一,在于临床应用单抗诊断与治疗人类疾病。但目前,绝大多数单抗都是应用小鼠杂交瘤技术制备的鼠单抗。从临床角度看,人单抗优于鼠单抗。因为患者摄入鼠单抗,作为一种异己蛋白质,总要冒过敏反应及发生免疫复合物病的风险。何况,人体对作为异种蛋白质的鼠单抗必然具有更快的清除速度。例如, Burton 等人用鼠抗人 T 细胞单抗(OKT₃)治疗同种肾移植物排斥范象,11 例患者均出现发热、寒颤、皮疹,尚有一例出现支气管痉挛。而且 11 例患者均先后出现抗 OKT₃ 抗体,此时即使增加 OKT₃ 治疗量也无效^[120]。由此可知,生产人单抗是势在必行,但因人骨髓瘤细胞的培养条件比较苛刻,生长速度又慢,尚需进行研究与试验。就目前而言,人单抗的研制主要有两种方法: (1) 经典的杂交瘤技术,即用人骨髓瘤细胞系或淋巴母细胞系(LCL)与人免疫 B 细胞融合的人×人杂交瘤技术; (2) 利用 EB 病毒转化技术结合细胞克隆化技术,建立分泌人单抗的永久性抗原专一的 B 细胞系。显然,生物大分子印渍术在杂交瘤的筛选中,在病毒转化的鉴别中,以及在克隆技术的甄别中都将是一项有效的技术。

此外,在印渍术中,也常利用单抗作为探针去探测其相关抗

原。这类方法也常成为某些疾病临床诊断的手段之一。下面将具体列举一些印渍术应用于单抗研究与实践的实例。

制造单抗时最重要的因素之一，就是快速地筛选出杂交瘤培养物上清液中的相应单抗。过去，这种筛选是把抗原结合到微量滴定板上，然后进行放免分析。这种方法的成功与否往往与抗原能否吸附到塑料板表面有关。为此，Sternberg 和 Jeppesen 改用 3 点印渍术^[121]。他们所用抗原为中国仓鼠染色体、染色体核心蛋白和细胞核等，对照为低分子量的蛋白质标准系列商品。操作时，把上述各抗原均一分为二，分别用 KCM 缓冲液 (120 mM KCl, 20 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) 悬浮，或者用变性缓冲液 (1% SDS, 50 mM DTT, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8) 溶解，然后分别用毛细管以圆点的形式点于 NC 纸上。此种 NC 印渍纸呈圆形，直径 92 mm。用前，先用笔划上 5 mm 的方格，抗原样品即点在各方格之交叉点处。每点用量约 $0.5 \mu\text{l}$ ，相当于 $0.1 \sim 1.0 \text{ mg}$ 蛋白质。点样毕，在室温下用 50 ml、内含 5% 小牛血清的 Tris-盐水 (0.9% NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) 浸洗 30 分钟，以猝灭 NC 纸上剩余结合力。取一只塑料平皿，内铺一张事先用 Tris-盐水浸湿的普通滤纸，把上述洗好的 NC 纸放在普通滤纸上，再把杂交瘤各培养物上清液分别点在原来点有抗原的斑点处 (即交叉点)，用量为每点 $1 \mu\text{l}$ 。盖上平皿，室温下静置 30 分钟。取出 NC 纸，顺次用 100 ml Tris-盐水、100 ml 内含 0.05% NP 40 的 Tris-盐水，和 100 ml Tris-盐水各洗 10 分钟。把洗过的 NC 纸放入内含 5% BSA 和 $5 \times 10^5 \text{ cpm/ml}$ ^{125}I -标记 F(ab)_2 的兔抗鼠 IgG 的 Tris-盐水中，振荡 45 分钟。最后，如上述洗涤后干燥，并进行放射自显影。显然，经上述试验后，凡能和总的染色体蛋白质以及染色体核心蛋白 (Core protein) 起

反应的培养物中,都含有针对该核心蛋白抗原的单克隆抗体,并在放显谱上显现斑点;反之,则无斑点。如上述直径为 92 mm 的 NO 圆片上,一次可筛选杂交瘤培养物 80 份,而且还能指示抗体特异性。例如上述实验中,他们把所试抗原相应的单抗编号为 4G8 和 2C6。这是因为,单抗 4G8 能结合到 SDS 变性的染色体和细胞核上,但不能和未变性状态者反应。单抗 2C6 却可与这两种处理的染色体和细胞核都发生反应^[191]。

Mathew 等人最近创造了一种称为用受体介电的电诱发细胞融合技术来制备单克隆抗体^[122]。他们用免疫印渍术分析了新法和各种原有方法的特性,指出新法所得单抗都具有高度的特异性,新法可以减少免疫次数,节省抗原用量,大大减轻了筛选工作,能得到高亲和力的单克隆抗体。

在利用免疫印渍术和点印渍术筛选单克隆抗体的工作中, Towbin 等人的工作尤为突出^[123]。他们采用了如表 6-5 所列各种筛选方法,从杂交瘤培养物上清液中筛选出针对鸡核糖体蛋白 S6、L7、L18a、P1/P2, 以及针对核糖体 RNA 的单克隆抗

表 6-5 用各种免疫原免疫小鼠后,其脾细胞和杂交瘤细胞融合和筛选方法

融合号	名称		免疫原	筛选方法	抗体类别	结合核糖与否
	杂交瘤	抗体				
1	XP2	抗-L18a	40S+60S	RIA; ELISA	IgG1, k	-
2	VA2	抗-S6	S6	ELISA; 免疫印渍法	IgG1, k	-
	IIC3	抗-S6			IgG1, k	-
3	IID4	抗-L7	60S	点印渍法; 免疫印渍法	IgM, k	-
	IVA1	抗-RNA			IgM, k	+
4	XD2	抗-P	TP80	点印渍法; 免疫印渍法	IgM, k	+

RIA, 放射免疫测定法; ELISA, 酶联免疫吸附测定法。不同融合号的融合条件不同。

体。由表可知,印渍术是主要筛选方法,RIA 和 ELISA 法主要用来比较印渍术的灵敏度。实验中,Towbin 等人筛选出一种针对位于核糖体大亚基 38 kDa 蛋白质的新的单抗,并取名为 PO^[123]。他们用此 PO 作为探针,再用印渍术探测了不同物种核糖体的蛋白质。证明,在所有被试的物种中都存在这种相关抗原^[123]。值得提出的是,Towbin 等人在此工作中报道了可逆染色法,即先用可逆性染料使印渍纸显现全谱,用笔作好标记后洗去染料,再改用探针进行免疫检出(详见第四章)。这样做,又使印渍术进一步简化,节省了筛选或检出时间。

Hawkes 等人也用点印渍术从超免疫小鼠脾细胞和骨髓瘤系细胞融合的杂交瘤培养物中,筛选针对突触体质膜蛋白的单克隆抗体^[96]。他们指出,采用点印渍时,可直接取杂交瘤培养物的上清液进行上述试验,而不必稀释。经此法筛选出的一种针对鼠脑抗原 MIT-23 的单克隆抗体,又被用作探针,并用点印渍术分析了来自各种鼠组织粗匀浆物,以了解其组织分布,结果如图 6-10 所示。图中,L、C、F、K、T、S 和 H 分别代表小鼠的肝、小脑、前脑、肾、胸腺、横纹肌和心肌。由图可知,MIT-23 只存在于小脑和前脑中,其它被试组织中均不存在^[26]。

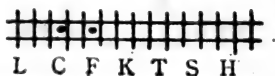


图 6-10 用点印渍术分析鼠脑 MIT-23 的组织分布

在利用免疫印渍术检出各种抗原物质的研究中,使用单抗作为探针的例子就更多了。例如补体第三成分(C_3)是补体系统的关键成分,已知人 C_3 有着遗传多态性,迄今已知 C_3 的等位基因超过 20 个。Koch 和 Behrendt 最近用免疫印渍术,以 C_3F 作抗原,从细胞融合培养上清液中筛选出一个被称为 HAV₁

的单克隆抗体^[124]。他们再以 HAV₄₋₁ 为探针,用免疫印渍术对各种人血浆中的 C₃ 衍生物进行检测,发现单抗 HAV₄₋₁ 仅同 C₃F 而不与 C₃S 反应。以全反应性人 C₃ 特异性单抗 HAV₃₋₅ 作为对照,用免疫印渍术检测了 203 个人的血浆样本,结果发现某些具 C₃S 的人与 HAV₄₋₁ 有反应,而某些具 C₃F 者不与 HAV₄₋₁ 反应。其中, C₃S 人 HAV₄₋₁ 阳性者占 1.9%, 而 C₃F 人 HAV₄₋₁ 阳性者占 11.3%^[124]。他们发现的这种新的人 C₃ 多态性是基于小鼠单抗同 C₃ 分子的反应性而不是基于电荷差异。目前尚不知 C₃ 多肽链(α 或 β)或裂解产物中,哪一部分携带此决定基。

戴莹和 Chwyzer 在用酶切图谱法确定猿猴病毒 40(SV40) 大 T 抗原上单克隆抗体结合位置时,也主要采用免疫印渍术^[125]。在她们的实验中采用了单抗 PAb₄₁₆, PAb₄₀₂ 和 PAb₄₂₃₅。PAb 是乳多空病毒蛋白质抗体(Papovavirus protein antibody) 的缩写。实验时,她们把 SV 40 的大 T 抗原用各种蛋白酶消化,所得片段经 SDS-12.5% PAGE 分离后,用扩散印渍法,双方向印渍 24~48 小时。得到的印渍纸经猝灭后,用 ¹²⁵I-标记的上述单抗作为探针进行探测。最后放射自显影并分析得到各单抗在大 T 抗原上的结合位置,证明 PAb₄₁₆ 结合到大 T 抗原 N 端的 17 kDa 片段上; PAb₄₂₃ 结合到大 T 抗原 C 末端所得到的几个重叠片段上^[125]。

八、在各种传染病病理研究与临床 诊断中的应用

从上述各节已不难看出,印渍术在遗传病、自身免疫病、癌症等病理探讨和临床诊断中已有一定应用。就目前已公布的资

料看,事实上印渍术已在众多疾病的病理学研究与临床诊断中发挥作用。例如在传染病方面,印渍术遍及各大类,包括蠕虫类、原生动物类、支原体、衣原体、细菌、病毒等等。就印渍术被应用的情况看大致可分四类^[115]: (1) 印渍抗原以测定病人的抗体谱; (2) 用印渍术鉴定包括单抗在内的抗体的特异性,以便用作病理学抗原检出的免疫学探针; (3) 印渍免疫球蛋白类,以确定类特异性 (Class specificity) 和 (或) 寡细胞系性 (Oligo-clonicity); (4) 直接把印渍术用于临床诊断。目前,上述第(2)类应用最多,第(4)类则刚开始。现把各种印渍术在传染病类的应用介绍于后。

蠕虫类传染病传染的免疫应答,因其非常复杂和难以获取增溶抗原制剂等原因,过去一直很难研究。现在,采用免疫印渍术,这些困难得到了克服。例如 Tsang 等人用印渍术研究了血吸虫传染的抗体特异性^[126]; Weiss 等人^[127]和 Lucius 等人^[128]分别用免疫印渍术测定了染有丝虫和绦虫病人的抗体谱。他们都认为,通过制备抗原或特异性抗体,就可用印渍术为这些传染病患者进行早期诊断^[126~128]。Gottstein 指出印渍术可以改善不同绦虫传染病之间血清学上差异的甄别^[129]。Miller 等人认为,免疫印渍术是检测中枢神经系统囊虫病的好方法^[130],它比以往采用的补体结合试验或间接血凝抑制试验等方法要灵敏得多。他们采用猪肉中囊虫的头节和囊壁冻干品作为抗原,以小圆点的形式点于溴化氰活化纸上,经猝灭步骤后,取 $5\mu\text{l}$ 病人血清或 $10\mu\text{l}$ 病人脑脊液加到印渍纸的抗原斑点上,于室温下反应 18 小时。取出印渍纸,洗涤后再和结合有 IgG_1 、 IgG_2 和 IgG_4 的 ^{125}I -A 蛋白于室温下反应 3 小时。最后经洗涤、干燥、放射自显影,用 γ -计数器定量测定放射性。他们用此方法检测了 70 例病人血清和脑脊液中抗囊虫抗体。其中,脑室囊虫病 9 例

例;脑膜囊虫病 15 例;脑实质囊虫病 15 例;神经对照组 14 例;和疑似囊虫病 17 例。结果显示,脑室或脑膜囊虫病组病人血清和脑脊液抗体水平(63.9% 和 52%)与对照组(31.8% 和 2.13%)相比,均有显著差异, $p < 0.0005$ 。脑实质囊虫病组病人血清和脑脊液的抗体结合率(41.7% 和 10.4%)与对照组相比,也具有统计学意义($p < 0.001$ 和 $p < 0.0005$)。脑室、脑膜囊虫病组所有病人血清和脑脊液抗体水平同时明显增高。脑实质囊虫病 15 例病人中,2 例的脑脊液抗体明显增高,11 例血清或(和)脑脊液抗体水平中等增高。对照组 14 例中,仅有 1 例为中等水平增高,其余均不增高。Miller 等人指出,点印渍术检测脑室、脑膜囊虫病敏感性为 100%,脑实质囊虫病敏感性为 86%,假阳性为 7%。因此认为,用点印渍术同时检测血清和脑脊液抗囊虫特异性抗体,可提高囊虫病临床诊断的准确性^[130]。

原生动物侵入人体也引起许多疾病。Kettis 等人证明,应用免疫印渍术能对痢疾阿米巴 (*Entamoeba histolytica*) 作出血清学上应答,因此可作为肠外传染较好的血清诊断 (Serodiagnosis)^[131]。Partanen 等人^[132]、Erlieh 等人^[133],以及 Sharma 等人^[134]全都研究过弓形体病 (Toxoplasmosis) 免疫应答中病人的血清图谱,免疫印渍术能显示出这类肽谱的免疫应答,故可用作弓形体病的诊断目的。Ogata 等人^[135]曾详细介绍了用单克隆抗体和抗生物素-生物素联抗体等作为探针,采用免疫印渍术检测弓形体膜抗原的具体方法。

在原生动物门中最受人注目的是疟原虫,因此采用印渍术研究和诊断疟疾已有许多报道。Anders 等人^[136]曾从血清学上研究过一种肽,此肽是由疟原虫分泌的,认为此肽可能就是使宿主免疫系统被压抑的分子基础。免疫印渍术分析表明,疟原虫是通过其高度的遗传变异性来逃避宿主的免疫系统。例如

Coppel 等人用印渍术分析发现^[137], 由一种具重复氨基酸序列的多肽产生的抗体, 能和疟原虫分泌的 220 kDa 的多肽起反应。后来, Holder 等人证明, 针对这种多肽生产的单克隆抗体是种特异性的(Species-specific), 而一种多克隆抗体则能起种间交叉反应^[138]。Taphaisri 等人用免疫印渍术研究了与疟区人群和疟疾病人血清发生反应的恶性疟的子孢子抗原成分^[139]。他们采用了已证明能减弱同种子孢子传染性的抗恶性疟(2A10)和抗间日疟(2F2)环子孢子蛋白的单抗。受试 3 组血清分别采自居住在疟区的 10 例健康人、10 例现症恶性疟患者(AM), 和 10 例脑型恶性疟患者(OM)。(事先, 经用间接荧光抗体试验和环子孢子沉淀试验, 都证明这些患者具有抗恶性疟和间日疟子孢子抗体。抗原为感染恶性疟和间日疟原虫的巴拉巴蚊的唾腺, 经解剖得到的活子孢子。免疫印渍术分析表明, 所有 3 组血清和同源的免疫小鼠血清, 对恶性疟环子孢子蛋白抗原均发生相似的免疫反应。与特异的单抗 2A10 相对应的抗原子孢子蛋白比较, 证明这是含有 4 种不同分子量多肽成分的蛋白质, 即 67,000 (Pf 67)、65,000 (Pf 65)、60,000 (Pf 60) 和 58,000 (Pf 58)。居住在疟区的 10 例健康人中发现有抗 Pf 60 和 Pf 58 两种多肽的抗体。其中, 7 例尚有抗 Pf 65 抗体, 3 例尚有抗 Pf 67 抗体。10 例 AM 和 10 例 OM 病人均有抗 Pf 65、Pf 60 和 Pf 58 抗体。此外, 印渍术分析还证明, 恶性疟和间日疟环子孢子蛋白有种特异性和期特异性。即, 在血内时期的原虫中它们并不存在, 而且它们只与同种相应抗体发生反应; 恶性疟子孢子抗原既不和单抗 2F2 反应, 也不和用间日疟子孢子免疫的小鼠血清起反应。相反, 单抗 2A10 和间日疟环子孢子蛋白也不发生反应。10 例正常人血清及正常蚊的唾腺在上述印渍试验中均阴性。由此证明, 环子孢子蛋白是自然感染恶性疟引起抗体应答的主要抗原

成分。

关于支原体(*Mycoplasma*)和衣原体(*Chlamydia*)感染的印渍术诊断也有一些报道。例如 Wise 和 Watson 曾开发了一种支原体抗原特异的、存在于感染细胞表面表达的单克隆抗体,用它作探针即可用免疫印渍术进行临床诊断^[140]。针对衣原体多肽的免疫应答,也用免疫印渍术分析过被衣原体感染的病人血清^[141]。Matikainen 和 Terho 还开发了特异性抗体探针,认为它在衣原体的临床诊断中可用作印渍术检验的工具^[142]。

由细菌引起的疾病,其病理研究和诊断已有大量的采用印渍术的报道。Swansson 等用多克隆抗体^[143]、后来又用单抗^[144]作为探针,用免疫印渍术研究过淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)的外膜结构。Gubish 等人为了鉴定淋球菌菌毛的受体,免疫印渍了宿主的蛋白质^[28]。过去一直认为密螺旋体属(*Treponema*)感染的免疫应答相当复杂。后来, Hanff 等人采用免疫印渍术测定了梅毒螺旋体(*Treponema Pallidum*)感染进程免疫反应的全貌^[145],解答了梅毒感染中循环着的免疫复合物是否含自身抗原类,或螺旋体抗原类的问题。现在, Baughn 等人已把免疫印渍术用于鉴定存在于这种免疫复合物中的密螺旋体抗原^[146]。俗称壁虱的蜱对螺旋体的传染负有责任,这一结论也是用免疫印渍术分析得到的。Barbour 等人使用了病人血清和一种单抗进行免疫印渍,发现存在于病人的抗原和从壁虱中分离出来的螺旋体之间显示出抗原同一性^[147,148]。霍乱肠毒素是霍乱的重要致病因素,熊凌霜和马清钧利用大肠杆菌热敏肠毒素 LT 基因作为探针,采用 DNA 印渍术对霍乱弧菌中的霍乱肠毒素基因作了侦察与定位^[149]。此工作为进一步研制抗霍乱遗传工程菌疫苗提供了必需的资料。周翊钟等人采用点印渍术,在溴化氰活化印渍纸上检出肝炎病人血清中特异性蛋

白质,认为点印渍术适用于婴幼儿和流行病病原体的微量检测^[150]。麻风病人中的免疫应答,也曾用免疫印渍术分析过。例如 Chakrabarty 等人鉴别了麻风分支杆菌 (*Mycobacterium leprae*) 抗原^[151], Miller 等人则鉴定出一种异源性多糖抗原^[152]。它们的单抗特异性也曾用免疫印渍术测定过^[153, 154], 这些都为麻风的早期诊断和有关流行病检查提供了优良的诊断试剂。

免疫印渍术最显著的应用之一是在病毒感染的血清学分析。病毒较难培养, 抗原又极为复杂, 加之溶解度差, 经典方法常难作出正确判断。相反, 免疫印渍术只需少量样品, 高的分辨率和灵敏度使之成为研究病毒感染的主要方法。Hall 和 Choppin 使用免疫印渍术检出时指出, 在患有亚急性硬化性全脑炎的病人脑中, 缺失一种麻疹病毒肽^[155]。Dörries 和 Ter-Meulen 则鉴定出一种直接针对柯萨奇病毒 (Coxsackievirus) 感染出现的特异性肽的 IgM 抗体^[156]。印渍术也已被用于研究 B 型肝炎中抗原的本质。McMichael 等人把血清中 HBs 抗原在电泳时出现的迁移率的变化和病情的发展联系起来^[157]。他如脊髓灰质炎病毒^[158]、涎腺病毒^[159]、副流感病毒^[29]、疱疹病毒^[14]等等, 都曾使用免疫印渍术分析过。顺便提一下, 农、牧业的一些病毒也可用印渍术分析鉴定。例如, O'Donnel 等人就提出过采用免疫印渍术检定来源于野地的植物病毒抗原的具体操作^[160]; Rybicki and Wechmar 也用免疫印渍术分析植物病毒^[161]。Roseto 等人用免疫印渍术对牛病毒的研究^[162], 有可能开创印渍术在兽医学方面的应用。至于印渍术在昆虫病毒抗原类的研究, 已有不少报道, 可望在农业害虫的控制中发挥作用^[163~167]。

本章所举例子只是印渍术应用的极少部分, 鉴于印渍术的高分辨率、高灵敏度、高度稳定性、设备简单、操作容易等特点, 使它已在生命学科各领域受到人们的重视, 对其应用也越

来越广泛。就医学领域而言,除了印渍术的上述特点外,若采用点印渍术,因能一次操作完成数百抗原的血清学分析而更为人们所瞩目。可以预料,印渍术在临床检验中必有远大前程,并可能替代许多现有的标准检验方法。

印渍术初创至今仅有十二年历史,方法学上还在不断创新与发展,作者渴望这本小册子能为她繁花似锦的前程,添上一片小绿叶。本书中有关作者的研究工作得到国家自然科学基金资助。

参 考 文 献

- [1] Frossard, P. et al., *Anal. Biochem.*, 134: 265, 1983.
- [2] Bittner, M. et al., *ibid.*, 102: 459, 1980.
- [3] Taylor, G. B., *ibid.*, 148: 524, 1985.
- [4] Alwine, J. C. et al., *Enzymol. Methods*, 68: 15, 1979.
- [5] 李宝珪等, *生物化学与生物物理进展*, 3: 46, 1986.
- [6] Bowen, B. J. et al., *Nucleic Acids Res.*, 8: 1, 1980.
- [7] Aubertin, A. M. et al., *Anal. Biochem.*, 131: 127, 1983.
- [8] Gershoni, J. M. and G. E. Palade, *ibid.*, 131: 1, 1983.
- [9] Flanagan, S. D. and B. Yost, *ibid.*, 140: 510, 1984.
- [10] Cardin, A. B. et al., *ibid.*, 137: 368, 1984.
- [11] Steup, M. and K-P. Gerbling, *ibid.*, 134: 96, 1983.
- [12] Ohlsson, B. G. et al., *ibid.*, 152: 239, 1986.
- [13] Thompson, G. A. et al., *ibid.*, 148: 288, 1985.
- [14] van den Berg, R. J., *ibid.*, 155: 149, 1986.
- [15] De Blas, A. L. and H. M. Chewink, *ibid.*, 133: 214, 1983.
- [16] Tsang, V. C. W. et al., *Enzymol. Methods*, 92: 377, 1983.
- [17] Knecht, D. A. and R. L. Dimond, *Anal. Biochem.*, 136: 180, 1984.
- [18] Bradbury, W. C. et al., *ibid.*, 137: 129, 1984.
- [19] Neumaier, M. et al., *ibid.*, 156: 76, 1986.
- [20] Daniel, T. D. et al., *J. Biol. Chem.*, 258: 4003, 1983.
- [21] Gershoni, J. M. and G. E. Palade, *J. Cell Biol.*, 95: 422, 1982.
- [22] Hossenlopp, P. et al., *Anal. Biochem.*, 154: 138, 1986.
- [23] Fernandez-Pol, J. A., *FEBS Lett.*, 143: 86, 1982.

- [24] Haenptle, M. T. et al., *J. Biol. Chem.*, 258: 305, 1983.
- [25] Islam, M. N. et al., *Endocrinology*, 113: 436, 1983.
- [26] Hawkas, R. *Anal. Biochem.*, 123: 143, 1982.
- [27] Elkou, K. B. et al., *ibid.*, 148: 524, 1985.
- [28] Gubish, Jr., et al., *Infect. Immun.*, 37: 189, 1982.
- [29] Gershoni, J. M. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 856: 19, 1986.
- [30] Hayman, E. G. et al., *J. Cell Biol.*, 95: 20, 1982.
- [31] 潘华珍等, *生物化学与生物物理进展*, 1: 35, 1986.
- [32] 张云南等, *中国医学科学院院报*, 1: 57, 1979.
- [33] 王家槐, *生命的化学*, 5(3): 4, 1985.
- [34] Deininger, P. L., *Anal. Biochem.*, 135: 247, 1983.
- [35] 黄承汉, *生命的化学*, 6(4): 19, 1986.
- [36] Church, C. and W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1991, 1984.
- [37] Maxam, A. M. and W. Gilbert, *Enzymol. Methods*, 65: 499, 1980.
- [38] 王尧, *生命的化学*, 7(2): 46, 1987.
- [39] Southern, E. M., *Cytogenet Cell Gente.*, 32: 52, 1982.
- [40] James, V. et al., *Diabetes*, 33: 200, 1984.
- [41] 马大龙, *国外医学(分子生物学分册)*, 7(5): 201, 1985.
- [42] Campbell, K. D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4464, 1983.
- [43] 水野猛, *生化学(日)*, 56(2): 113, 1984.
- [44] 张锡元, *国外医学(分子生物学分册)*, 7(5): 235, 1985.
- [45] Deisseroth, A. et al., *Cell*, 12: 205, 1977.
- [46] Deisseroth, A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 1456, 1978.
- [47] Kao, F. T. et al., *ibid.*, 79: 865, 1982.
- [48] Kao, F. T., *Internatl. Rev. of Cytology*, 85: 109, 1982.
- [49] Law, H. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 7390, 1982.
- [50] Anurag, D. et al., *Science*, 223: 1312, 1984.
- [51] Breathnach, R. et al., *Nature*, 270: 314, 1977.
- [52] Wiborg, O., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1067, 1984.
- [53] Cleveland, D. W. et al., *Cell*, 15: 1021, 1978.
- [54] Cowan, N. J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 4877, 1981.
- [55] Leicht, M. et al., *Nature*, 297: 655, 1982.
- [56] 蒋栋良, *国外医学(分子生物学分册)*, 7(3): 106, 1985.
- [57] Razin, A. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 782: 331, 1984.
- [58] Razin, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 2275, 1984.

- [59] Groffen, J. et al., *Virology*, 123: 213, 1983.
- [60] Feinberg, A. P. et al., *Nature*, 301: 89, 1983.
- [61] Kunnath, L. et al., *Nucleic Acids Res.*, 10: 3877, 1982.
- [62] 黄承汉, 生命的化学, 6(4): 21, 1986.
- [63] 党进军和孙志贤, 生物化学与生物物理进展, 4: 12, 1986.
- [64] Rozen, R. et al., *Nature*, 313: 815, 1985.
- [65] 朱运松和宋后燕, 国外医学(分子生物学分册), 7(4): 163, 1985.
- [66] Rotwein, P. et al., *New Engl. J. Med.*, 308: 65, 1983.
- [67] Rotwein, P. et al., *Science*, 213: 1117, 1981.
- [68] Furter, R. et al., *Nucleic Acids Res.*, 14: 6357, 1986.
- [69] Dalton, S. et al., *ibid.*, 14: 6507, 1986.
- [70] 黎志豪, 国外医学(分子生物学分册), 4(2): 93, 1982.
- [71] 崔宏等, 中华微生物学和免疫学杂志, 5(3): 133, 1985.
- [72] Ratzkin, B. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 3313, 1980.
- [73] Hung, P. P., *Miami Winter Symp.*, 19: 429, 1982.
- [74] 谷淑燕等, 中华微生物学和免疫学杂志, 4(5): 281, 1984.
- [75] Mucutchan, T. F. et al., *Science*, 225: 625, 1984.
- [76] Chiu, J. F. et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 222: 310, 1983.
- [77] Cheah, M. S. C. et al., *Nature*, 319: 238, 1986.
- [78] 沈绿萍, 生命的化学, 6(2): 15, 1986.
- [79] Chang, J. C. et al., *New Engl. J. Med.*, 307: 30, 1982.
- [80] Old, M. et al., *Lancet*, II: 1413: 1982.
- [81] 曾溢滔等, 上海医学, 10(1): 1, 1987.
- [82] Dozy, A. M. et al., *Nature*, 280: 605, 1979.
- [83] Whitelaw, E. et al., *Blood*, 55: 511, 1980.
- [84] 朱康儿, 国外医学(分子生物学分册), 4(2): 64, 1982.
- [85] Franzén, L. et al., *Lancet*, I: 525, 1984.
- [86] Lau, Y. F. et al., *ibid.*, 8367: 14, 1984.
- [87] 桂建芳和张奇亚, 生命的化学, 4(6): 9, 1984.
- [88] 张友尚, 同上, 7(1): 1, 1987.
- [89] Goff, S. P. et al., *Cell*, 22: 777, 1980.
- [90] Favera, F. D., *Nature*, 292: 31, 1981.
- [91] Humphries, P., *ibid.*, 293: 146, 1981.
- [92] 静国忠, 生物化学与生物物理进展, 4: 2, 1986.
- [93] Conner, B. J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 278, 1983.

- [94] Kidd, V. T. et al., *Nature*, 304: 230, 1983.
- [95] 赵斌华, 国外医学(免疫学分册), 8(1): 1, 1985.
- [96] Johson, H. M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 4171, 1982.
- [97] Inaba, K. et al., *J. Exp. Med.*, 158: 2040, 1983.
- [98] 朱迅和田志刚, 国外医学(免疫学分册), 10(2): 61, 1987.
- [99] Taniguchi, T. et al., *Nature*, 302: 305, 1983.
- [100] Devos, R. et al., *Nucleic Acids Res.*, 11: 4307, 1983.
- [101] Maeda, S. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 115: 1040, 1983.
- [102] Fujita, T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 68, 1985.
- [103] Holbrook, N. J. et al., *ibid.*, 81: 1634, 1984.
- [104] Holbrook, N. J. et al., *Nucleic Acids Res.*, 12: 5005, 1984.
- [105] Clark, S. C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 2543, 1984.
- [106] Hirano, T. et al., *J. Immunol.*, 132: 2165, 1984.
- [107] Blattner, F. R. and P. W. Tucker, *Nature*, 307: 417, 1984.
- [108] Xu, X-H. and D. E. McFarlin, *Neurol.*, 34: 769, 1984.
- [109] Rostrom, B. et al., *Ann. Neurol.*, 9: 569, 1981.
- [110] 许贤豪, 中华微生物学和免疫学杂志, 5(3): 157, 1985.
- [111] Wood, C. R. et al., *Nature*, 314: 446, 1985.
- [112] Lefranc, M. P. et al., *ibid.*, 300: 760, 1983.
- [113] Koh, L. Y. et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 64: 471, 1986.
- [114] Towbin, H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350, 1979.
- [115] Towbin, H. and J. Gordon, *J. Immunol. Methods*, 72: 313, 1984.
- [116] Hardin, J. A. and J. O. Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 7410, 1984.
- [117] Zabriskie, J. B. and J. E. Friedman, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 161: 457, 1983.
- [118] Gordon, J. and M. Roseenthal, *J. Rheumatol.*, 28: 231, 1984.
- [119] Sikora, K. and H. M. Smedley(范培昌、秦德安译), 单克隆抗体, 上海科学技术文献出版社, 1987.
- [120] Burton, R. C. et al., *J. Clin. Immunol.*, 2: 142, 1982.
- [121] Sternberg, J. and P. Jeppesen, *J. Immunol. Methods*, 64: 39, 1983.
- [122] Mathew, M. S. L. et al., *Nature*, 310: 792, 1984.
- [123] Towbin, H. et al., *J. Biol. Chem.*, 257: 12709, 1982.
- [124] Koch, C. and N. Behrendt, *Immunogenetics*, 23: 322, 1986.
- [125] 戴莹和 M. S. Chwyzer, 中华微生物学和免疫学杂志, 4: 271, 1984.

- [126] Tsang, V. C. W. et al., *J. Parasitol.*, 68: 1034, 1982.
- [127] Weiss, N. et al., *Acta Trop.*, 39: 373, 1982.
- [128] Lucius, R. et al., *Tropenmed. Parasit.*, 34: 133, 1983.
- [129] Gottstein, B., *Immunoenzymatic Technique*(Avrameas, S. et al.eds.), Elsevier, Amsterdam, P. 229, 1983.
- [130] Miller, B. et al., *Neurology*, 34: 695, 1984.
- [131] Kettis, A. A. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 512, 1983.
- [132] Partanan, Pet al., *FEBS Lett.*, 158: 252, 1983.
- [133] Erlich, H. A. et al., *Infect. Immun.*, 41: 683, 1983.
- [134] Sharma, S. D. et al., *J. Immunol.*, 131: 977, 1983.
- [135] Ogata, K. et al., *J. Immunol. Methods*, 65: 75, 1983.
- [136] Anders, R. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 6652, 1983.
- [137] Coppel, R. L. et al., *Nature*, 306: 751, 1983.
- [138] Holder, A. A. et al., *Mol. Biochem. Parasitol.*, 9: 191, 1983.
- [139] Taphaisri, P. et al., *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth*, 16: 355, 1985.
- [140] Wise, K. S. and P. K. Watson, *Infect. Immun.*, 41: 1332, 1983.
- [141] Saikku, F. et al., *J. Clin. Microbiol.*, 17: 22, 1983.
- [142] Matikainen, M. T. and P. Terho, *J. Gen. Microbiol.*, 129: 2343, 1983.
- [143] Swanson, J. et al., *Infect. Immun.*, , 38: 668, 1982.
- [144] Swanson, J. and O. Barrera, *J. Exp. Med.*, 157: 1405, 1983.
- [145] Hanff, P. A. et al., *J. Immunol.*, 129: 1287, 1983.
- [146] Baughn, R. E. et al., *Infect. Immun.*, 42: 585, 1983.
- [147] Barbour, A. G. et al., *J. Clin. Invest.*, 72: 504. 1983.
- [148] Barbour, A. G. et al., *Infect. Immun*, 41: 795, 1983.
- [149] 熊凌霜和马清钧, *中华微生物学和免疫学杂志*, 5(6): 379, 1985.
- [150] 周翊钟等, 同上, 5(1): 62, 1985.
- [151] Chakrabarty, A. K. et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 49: 523, 1982.
- [152] Miller, R. A. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32: 555, 1983.
- [153] Gillis, T. P. and T. M. Buchanan, *Infect. Immun.*, 37: 172, 1982.
- [154] Ivanyi, J. et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 52: 528, 1983.
- [155] Hall, W. W. and P. W. Choppin, *New Engl. J. Med.* 304: 1152, 1981.
- [156] Dörries, R. and V. TarMeuleu, *J. Gen. Virol.*, 64: 159, 1983.
- [157] McMichael, J. C. et al., *I. Immunol. Methods*, 45: 79, 1981.
- [158] Brioen, P. et al., *Arch. Virol.*, 74: 325, 1982.

- [159] Weiner, D. and W. Gibson, *Virology*, 115: 182, 1981.
- [160] O'Donnel, L. J. et al., *J. Virol. Methods*, 4: 19, 1982.
- [161] Rybicki, E. P. and E. B. Von Wechmar, *ibid.*, 5: 267, 1982.
- [162] Reseto, A. et al., *C. R. Acad. Sci. Paris*, 294: 347, 1982.
- [163] Smith, G. E. and M. D. Summers, *J. Virol.*, 39: 125, 1981.
- [164] Naser, W. L. and H. G. Miltenburger, *FEBS Microbiol. Lett.*, 15: 261, 1982.
- [165] Naser, W. L. and H. G. Miltenburger, *J. Gen. Virol.*, 64: 639, 1983.
- [166] Hohmann, A. W. and P. Faulkner, *Virology*, 125: 432, 1983.
- [167] Knell, J.D. et al., *ibid.*, 125: 381, 1983.

本书所用缩写或简称

ABM	Aminobenzyloxymethyl cellulose 氨基苄氧甲基纤维素
AFP	α -f(o) etoprotein 甲胎蛋白
Alb	Albumin 白蛋白
APT	Aminophenylthioether cellulose 氨基苯硫醚纤维素
BAC	Bisacrylylcystamine 双丙烯酰基光胺
BCP	5-Bromo-4-chloroindoxyl phosphate 5-溴-4-氯吲哚磷酸
Bio-dUTP	Biotin-labeled deoxyuridine triphosphate 生物素标记的脱氧三磷酸尿苷
BSA	Bovine serum albumin 牛血清白蛋白
BZ-Arg-pNA	<i>N</i> - α -Benzoyl-DL-arginine- <i>p</i> -nitroanilide hydrochloride <i>N</i> - α -苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基酰替苯胺盐酸盐
BZ-Tyr-pNA	<i>N</i> -Benzoyl-L-tyrosine- <i>p</i> -nitroanilide <i>N</i> -苯甲酰-L-酪氨酸-对硝基酰替苯胺
CalM	Calmodulin 钙调蛋白
cDNA	Complementary DNA 互补 DNA
Con A	Concanavalin A(伴)刀豆球蛋白 A
c-onc	Cellular oncogene 细胞(致)癌基因
DATD	<i>N</i> ', <i>N</i> '-Diallyltartardiamide <i>N</i> ', <i>N</i> '-二丙烯基酒石酸胺
DBM	Diazobenzyl oxymethyl cellulose(paper)重氮苄氧甲基纤维素(纸)
DexSO ₄	Dextran sulfate 葡聚糖硫酸酯
DHEBA	<i>N</i> , <i>N</i> '-(1, 2-Dihydroxyethylene)bisacrylamide 二羟乙撑双丙烯酰胺
DPT	Diazophenylthioether cellulose(paper)重氮苯硫醚纤维素(纸)

DTT	Dithiothreitol 二硫苏糖醇
EBV	Esptein-Barr virus EB 病毒; 非洲淋巴细胞瘤病毒
EDA	Ethylene diacrylate 二丙烯酸乙酯
Gc	Anti-Gc globulin 抗 Gc 球蛋白
gp	Glycoprotein 糖蛋白
Hb	Hemoglobin 血红蛋白
HLA	HL-A antigen HL-A 抗原; 有核细胞表面的组织相容性抗原
IHSV	Herpes simplex virus 单纯性疱疹病毒
IdC	¹²⁵ I-labeled deoxycytidine 碘标记脱氧胞苷
IdU	¹²⁵ I-labeled deoxyuridine 碘标记脱氧鸟苷
IEF	Isoelectric focusing 等电聚焦
g	Immunoglobulin 免疫球蛋白
kDa	kilo-Dalton 千道尔顿
LPS	Lipopolysaccharide 脂多糖
MBA	N, N'-Methylenebisacrylamide N, N'-甲叉双丙烯酰胺
Mes	2-(N-Morpholino) ethane sulfonic acid 2-(N-吗啉)-乙磺酸
Mr	Relative molecular weight 相对分子量
MuMTV	Murine mammary tumor virus 鼠乳房肿瘤病毒
NBM	Nitrobenzyloxymethyl cellulose 硝基苄氧甲基纤维素
NBPC	Nitrobenzyloxymethyl pyridine chlorinate 硝基苄氧甲基氯化吡啶
NBT	Nitroblue tetrazolium 硝基蓝四唑
NC	Nitrocellulose (paper) 硝酸纤维素(纸)
NP 40	Nonidet P-40 一种去污剂的商品名
OD(O. D.)	Optical density 光密度
onc	Oncogene 致癌基因
OTC	Ornithine transcarbamylase 鸟氨酸转氨甲酰酶
PAG	Polyacrylamide gel 聚丙烯酰胺凝胶

PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis 聚丙烯酰胺凝胶电泳
PAGEF	Isoelectric focusing on PAG 在聚丙烯酰胺凝胶上的等电聚焦
PBS	Phosphate-buffered saline 磷酸盐缓冲的生理盐水
PEG	Polyethyleneglycol 聚乙二醇
PGGE	Polyacrylamide concentration gradient gel electrophoresis 聚丙烯酰胺浓度梯度凝胶电泳
PHA	Phytoh (a) emagglutinin 植物凝集素
PLP	Pyridoxal phosphate 磷酸吡哆醛
PNH	Hemoglobinuria 血红蛋白尿症
PP	Polyvinylpyrrolidone 聚乙烯吡咯烷酮
PPO	2, 5-Dipheny oxyzole 2,5-二苯噻唑
PPxy	Phosphopyridoxyl 磷酸吡哆醛
PVPO	Polyvinylpyrrolidone 聚乙烯吡咯烷酮
RF	Rheumatismal factor 风湿因子
RFLP	DNA restriction fragment length polymorphism DNA 限制酶切片段长度多态性
SA	Streptococcus anti-biotin protein 链球菌抗生物素蛋白
SBE	Subacute bacterial endocarditis 亚急性细菌性心内膜炎
SV 40	Simian virus 40 猿猴病毒 40
TBS	Tris-buffered saline Tris 缓冲的生理盐水
Tf	Anti-transferrin 抗铁传递蛋白
TK	Thymidine kinase 胸苷激酶
TMP	Trimethyl psoralen 三甲基补骨脂素
TMV	Tobacco mosaic virus 烟草花叶病毒
TN	10 mM Tris-HCl/0.9% NaCl, pH 7.4
TW	Tween 20 吐温 20
ZB	Zetabind 用于印渍的一种尼龙衬底膜之商品名。

PAGE

PAGE

PR

PR

WOOD

PHA

PHB

PHH

PR

PPO

PPV

PVPO

PHH

PHH

SA

SV

TS

TI

TK

TM

TV

TN

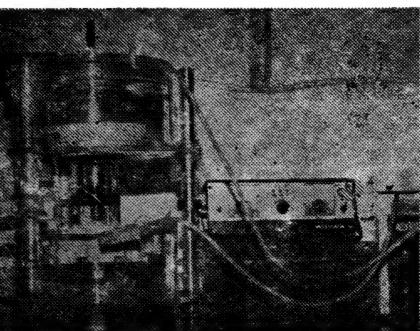
TV

EL

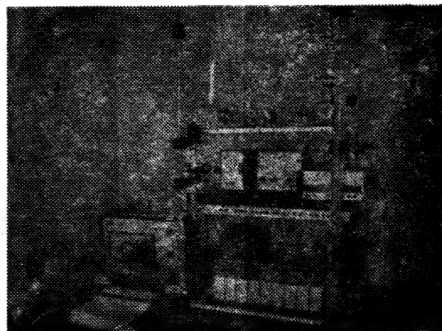
上海锦华实验器械厂

D 型凝胶大柱制备电泳仪

该装置由本厂与华东师范大学协作研究成功。系80年代最新产品（图A）。该装置具有如下特点：



（图A）



（图B）

- 1.柱大，上样量大，一次至少可上样1.5克蛋白质（或核酸）样品。
- 2.配有高效收集室，一次电泳可同时获得毫克量级的纯蛋白质（或核酸）。
- 3.样品无需预分离，可直接上柱。
- 4.采用常规电泳电源，在50mA下电泳柱温不会超过25℃。
- 5.采用“切补法”，可缩短分子量10万以上生物大分子的分离时间。

大柱包括：60×200、50×200、40×200（mm）三种。

本厂还生产Z型系列层析柱（图B）及其转换头、冷冻恒温循环槽、酸板洗涤器、可定量橡皮吸球、微孔膜滤器、H型伸缩台等。欢迎用户来厂、来函选购。

厂址：上海市康定路1484弄6号

电话：587435

电报挂号：0837



S0011801

90.1

西单店

5.70

146710

90.

58.17

330

25227

生物大分子印渍技术和应用

1989

借者	还期	借者	还期
90.21	张新川	95.26	6

58.17

330

注 意

- 1 借书到期请即送还。
- 2 请勿在书上批改圈点，折角。
- 3 借去图书如有污损遗失等情形须照章赔偿。

25227

京卡0701



责任编辑：叶德仁

封面设计：单晓报

ISBN 7-80513-333-6/Q·12

科技新书目：185-256 定价：5.70 元